

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica



TESIS DOCTORAL

**Mecanismo de acción del sistema plasminógeno-plasmina en
la fibrinólisis : estudios químico-físicos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Concepción Zamarrón Cuesta

Madrid, 2015

TP
983
207

Concepción Zamarrón Cuesta



x-53-016559-6

MECANISMO DE ACCION DEL SISTEMA PLASMINOGENO-PLASMINA
EN LA FIBRINOLISIS. ESTUDIOS QUIMICO-FISICOS

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid
1983



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº 257/83

© Concepción Zamarrón Cuesta
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1983
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-39681-1983

Autor:

CONCEPCION ZAMARRON CUESTA

**MECANISMO DE ACCION DEL SISTEMA
PLASMINOGENO-PLASMINA EN LA
FIBRINOLISIS. ESTUDIOS QUIMICO-FISICOS**

**MEMORIA para aspirar al grado de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS**

Director:

ARMANDO ALBERT MARTINEZ

Profesor de Investigación del C. S. I. C.

Instituto de Química Física «Rocasolano»

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

Madrid, 1982

La presente tesis ha sido realizada en el Instituto de Química Física "Rocasolano" del C.S.I.C. bajo la dirección del Profesor de Investigación Dr. D. Armando Albert Martinez, a quién expreso mi más profundo y sincero agradecimiento.

Expreso también mi agradecimiento por su continuo apoyo y ayuda en la realización de este trabajo a los Drs. Dña. Pilar Usobiaga Altuna, Dña. Teresa Díaz García-Mauriño, D. José L. Saiz Velasco, D. Edelmiro Regañón y Dña. Teresa Eirín, así como a Dña. Irene Romo y Dña. Consuelo Martín de Loeches y demás compañeros de laboratorio.

De igual forma quiero agradecer al Profesor D. Angel Martín Municio su cooperación al haber aceptado ser el ponente de esta tesis.

J. Albert

I N D I C E

<u>Agradecimientos</u>	I
<u>Indice</u>	II
<u>Abreviaturas</u>	VII
CAPITULO I.- <u>INTRODUCCION</u>	1
I.1.- HEMOSTASIA. COAGULACION. FIBRINOLISIS.	
ASPECTOS GENERALES	3
I.2.- SISTEMA FIBRINOLITICO	22
I.3.- OBJETIVOS	41
CAPITULO II.- <u>MATERIALES Y METODOS</u>	43
II.1.- PREPARACION DE FIBRINOGENO	44
II.1.1.- <u>Purificación de fibrinógeno</u>	44
II.1.2.- <u>Determinación de la concentración</u> <u>de fibrinógeno</u>	45
II.1.3.- <u>Determinación del porcentaje de</u> <u>proteína coagulable</u>	45
II.2.- PREPARACION DE FIBRINA	46
II.2.1.- <u>Obtención de coágulos de fibrina</u>	47
II.3.- PREPARACION DE PLASMA	47
II.3.1.- <u>Obtención de coágulos de fibrina</u>	48

- III -

II.4.- ESTABILIDAD DE LA FIBRINA	49
II.4.1.- <u>Reducción de enlaces disulfuro</u>	49
II.4.2.- <u>Electroforesis en gel de poliacrilamida</u> <u>en presencia de dodecil sulfato sódico</u> <u>(SDS-PAGE)</u>	50
II.5.- PREPARACION DE PLASMINOGENO	51
II.5.1.- <u>Caracterización del plasminógeno</u>	51
II.5.2.- <u>Determinación de la concentración</u> <u>de plasminógeno</u>	52
II.6.- PREPARACION DE ¹²⁵ I-PLASMINOGENO	52
II.6.1.- <u>Obtención y purificación de</u> <u>¹²⁵I-plasminógeno</u>	52
II.6.2.- <u>Medida de radiactividad</u>	53
II.7.- ACTIVADORES: DETERMINACION DE ACTIVIDAD PLASMINA.	54
II.7.1.- <u>Método fibrinolítico</u>	55
II.7.2.- <u>Método estereolítico</u>	56
II.7.3.- <u>Método amidolítico</u>	57
II.8.- TECNICAS EXPERIMENTALES DE ESTUDIOS DE UNION PLASMINOGENO-FIBRINOGENO(FIBRINA)	58
II.8.1.- <u>Métodos analíticos</u>	59
II.8.2.- <u>Método radiactivo</u>	61
II.8.3.- <u>Ultracentrifugación analítica</u>	63
II.9.- TECNICAS EXPERIMENTALES DE ESTUDIOS CINETICOS DE FIBRINOLISIS	64
II.9.1.- <u>Métodos espectroscópicos</u>	65
II.9.2.- <u>Digestión enzimática</u>	67

- IV -

II.10.- TECNICAS EXPERIMENTALES DE ESTUDIOS	
DE DIFUSION	69
II.10.1.- <u>Difusión en un volumen limitado</u>	
<u>(concentración exterior variable) ...</u>	69
II.10.2.- <u>Difusión en un volumen grande</u>	
<u>(concentración exterior constante) ..</u>	71
II.11.- MICROSCOPIA ELECTRONICA	71
CAPITULO III.- <u>RESULTADOS</u>	72
III.1.- INTERACCION PLASMINOGENO-FIBRINOGENO-FIBRINA.	
ESTUDIOS EN SISTEMA PURIFICADO	73
III.1.1.- <u>Unión plasminógeno-coágulo de</u>	
<u>fibrina. Aspectos macroscópicos</u>	73
III.1.2.- <u>Determinación de las constantes apa-</u>	
<u>rentes de asociación-disociación de</u>	
<u>los complejos Pg-Fg-Fn. Métodos</u>	
<u>analíticos</u>	77
III.1.3.- <u>Determinación de los sitios de unión.</u>	
<u>Estudios de unión ¹²⁵I-plasminógeno</u>	
<u>en presencia de inhibidor</u>	80
III.1.4.- <u>Estudios por ultracentrifugación ana-</u>	
<u>lítica de los complejos Pg-Fg: aspec-</u>	
<u>tos dinámicos de la interacción</u>	82
III.2.- INTERACCION PLASMINOGENO-FIBRINOGENO-FIBRINA.	
ESTUDIOS EN PLASMA HUMANO	88
III.2.1.- <u>Unión plasminógeno-coágulo de</u>	
<u>fibrina. Aspectos macroscópicos</u>	88

III.2.2.- <u>Determinación de la constante</u> <u>aparente de disociación plasminó-</u> <u>geno-fibrina</u>	92
III.2.3.- <u>Intercambio plasminógeno plasmático -</u> <u>¹²⁵I-plasminógeno</u>	93
III.3.- MECANISMO DE ACCION: ESTUDIOS CINETICOS DE FIBRINOLISIS EN SISTEMA PURIFICADO	93
III.3.1.- <u>Lisis de coágulos por activación</u> <u>externa del plasminógeno: distintos</u> <u>modelos</u>	93
III.3.2.- <u>Acción de los inhibidores del plasma</u> <u>sobre la lisis de coágulos de fibrina.</u>	100
III.4.- MECANISMO DE ACCION: ESTUDIOS CINETICOS DE FIBRINOLISIS EN PLASMA HUMANO	103
III.4.1.- <u>Lisis de coágulos naturales por</u> <u>activación externa</u>	103
III.4.2.- <u>Efecto de la concentración de plasmi-</u> <u>nógeno en la lisis de coágulos de</u> <u>plasma</u>	107
III.5.- ESTUDIOS DE LA LISIS DE COAGULOS PLASMATICOS EN FUNCION DE SU GRADO DE ENVEJECIMIENTO	111
III.5.1.- <u>Estudios cinéticos de lisis por acti-</u> <u>vación extrínseca de coágulos de dis-</u> <u>tintas "edades"</u>	111
III.5.2.- <u>Estudios de la unión de plasminógeno</u> <u>al coágulo de fibrina en función de</u> <u>su "edad"</u>	113

CAPITULO IV.- <u>DISCUSION</u>	118
CAPITULO V.- <u>CONCLUSIONES</u>	140
CAPITULO VI.- <u>BIBLIOGRAFIA</u>	145
APENDICE I .- <u>FORMACION DE FIBRINA</u>	161
APENDICE II.- <u>LISIS DE FIBRINA</u>	167

Abreviaturas

Ac	- Activador
α_2 -AP	- α_2 -antiplasmina
EDTA	- Acido etilendiaminotetraacético
Fg	- Fibrinógeno
Fn	- Fibrina
I	- Inhibidor
PDF	- Productos de degradación de la fibrina
Pg	- Plasminógeno
Pm	- Plasmina
SDS	- Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	- Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS..
SK	- Estreptoquinasa
S-2251	- H-D-Val-Leu-Lys-p-nitro anilida
TAME	- p-toluen sulfonil-L-arginina metil ester
TRIS	- Tris(hidroximetil)aminometano
UK	- Uroquinasa

CAPITULO I.- I N T R O D U C C I O N

En los últimos años, el número de casos clínicos conectados con el proceso de formación y lisis de coágulos de fibrina en el organismo ha incrementado notablemente. Actualmente, enfermedades cardio-vasculares junto con accidentes en carretera y cáncer constituyen las causas primeras de mortalidad mundial.

La Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) en las estadísticas anuales de 1979 y 1980, suministra los siguientes datos:

En Estados Unidos, de un total de 1.899.597 muertes registradas en 1977, 978.527 se deben a enfermedades del sistema circulatorio, cifra que representa el 51%.

En España, de un total de 298.192 muertes registradas en 1975, 131.343 se deben a dicha causa, lo que representa un 44%; en 1976, de un total de 299.007 muertes registradas, el 44,9% fueron debidas a dichas enfermedades.

En el campo de la investigación el tema coagulación-fibrinolisis ha despertado un gran interés debido al complejo sistema de mecanismos involucrados en el proceso, así como a la urgencia de llegar a una solución clínica. Si bien la mayoría de los estudios realizados hasta el momento han estado centrados

en el campo de la coagulación con un enfoque en terapia anticoagulante, en el campo de la fibrinólisis con proyección profiláctica se ha trabajado comparativamente mucho menos.

En el presente trabajo se ha pretendido llevar a cabo un estudio de los mecanismos de acción del sistema plasminógeno-plasmina sobre la fibrinólisis y obtener información básica sobre los aspectos químico-físicos implicados en la disolución del coágulo de fibrina. Estos estudios están encaminados a posibles aplicaciones terapéuticas en las enfermedades vasculares, sobre todo para los casos en que una terapia anticoagulante esté contraindicada.

En la primera parte de esta introducción se dará una visión general de los fenómenos de hemostasia, coagulación y fibrinólisis en sus aspectos estructurales, dinámicos y patológicos. En la segunda parte se hará un estudio químico-físico del Sistema Fibrinolítico, tanto de sus componentes como de su mecanismo de acción, para llegar a plantear las bases bioquímicas para una terapia, así como las cuestiones que aún permanecen sin resolver. Por último, en función de lo anterior, se expondrán los objetivos de este trabajo.

I.1.- HEMOSTASIA. COAGULACION. FIBRINOLISIS.

ASPECTOS GENERALES.

Todas las propiedades importantes de la sangre dependen del hecho de hallarse continuamente en movimiento; la localización estructural de este continuo fluir es el vaso sanguí-

neo. El binomio vaso-sangre es inseparable al abordar el tema de la hemostasia.

El término hemostasia incluye un número de mecanismos relacionados entre sí que garantizan la fluidez de la sangre en los vasos y la prevención de la hemorragia desde un vaso roto o dañado.

El principio básico de la técnica de cierre ante un daño vascular consiste en la formación de un coágulo que evita que se siga sangrando y actúa como un tapón provisional hasta que los tejidos subyacentes se hayan reparado.

La formación de este tapón hemostático, que impide la pérdida de sangre, es uno de los mecanismos más eficientes diseñado por el organismo para la homeostasis de su medio interno más vital. Su alta eficiencia es necesaria para el control de la hemorragia que puede acontecerle durante los muchos y variados ataques externos a lo largo de su vida tales como el parto, el nacimiento, el ciclo sexual femenino, etc.

La eficiencia hemostática es función de la coagulación sanguínea, la formación del tapón plaquetario y de la conservación de la integridad vascular. Esta eficiencia depende fundamentalmente del perfecto control de estos mecanismos que cuando fracasan por motivos congénitos o adquiridos, pueden llevar a una trombosis o a una aterosclerosis vascular.

En hemostasia se tienen que considerar:

- 1.- Los sistemas implicados en el fenómeno: sistema vascular, sistema plaquetario, sistema de coagulación, sistema fi-

brinolítico y sistemas asociados (calicreína-quinina, protaglandinas, complemento sérico, leucocitario y renina-an^giotensina).

- 2.- Los mecanismos homeostáticos implicados en la coordinación de los elementos de cada sistema, así como en las interacciones de unos sistemas con otros.

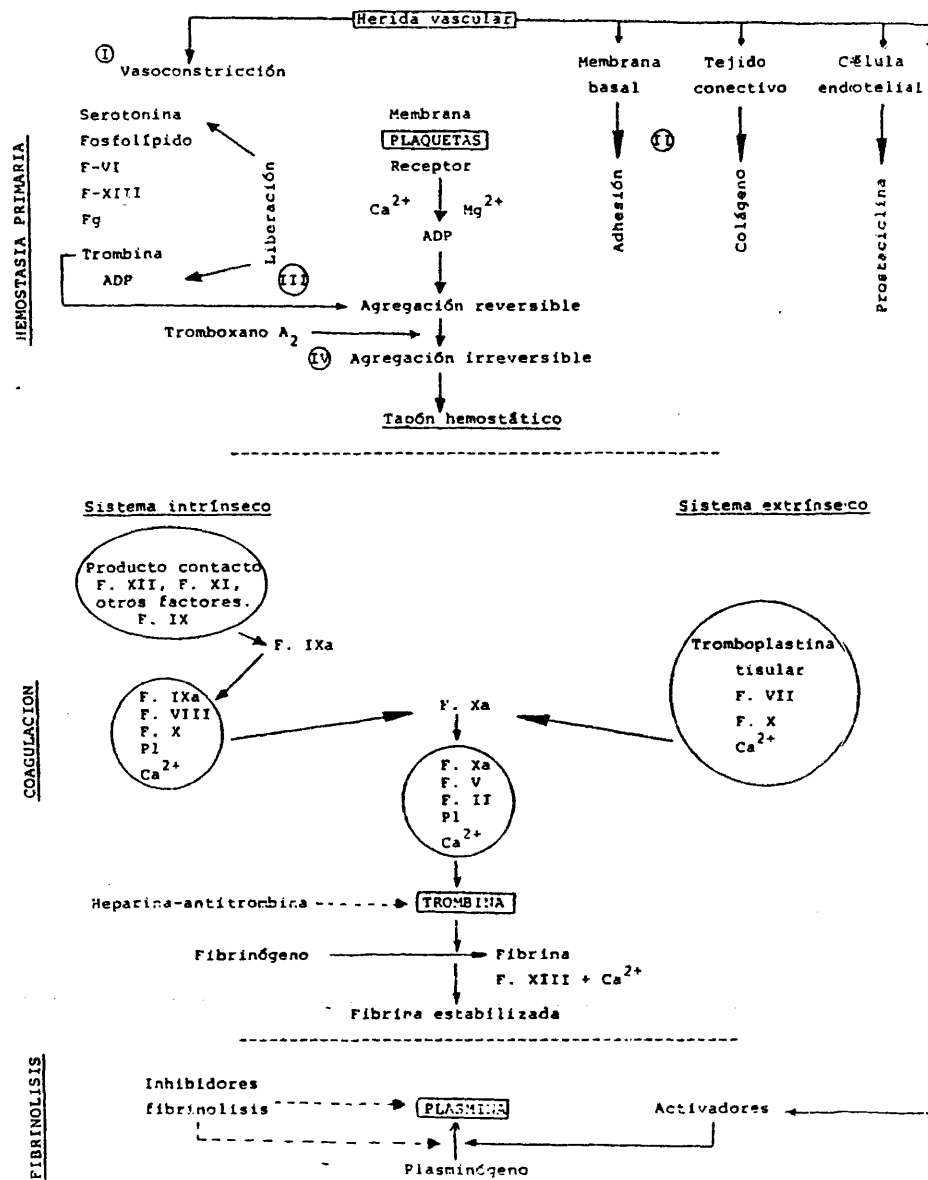
Los componentes estructurales principales del mecanismo hemostático son: la pared vascular, las plaquetas (hemostasia primaria) y el plasma, en el cual acontecen los mecanismos de coagulación y fibrinólisis. (Ver esquema n° 1).

Papel del sistema vascular en hemostasia.- El sistema vascular tiene tres funciones principales en hemostasia:

- 1.- La integridad vascular mantiene el flujo de sangre constante. En caso de herida, cuando la elastina y el colágeno del subendotelio vascular están expuestos a la sangre, las plaquetas comienzan a adherirse en la zona dañada para posteriormente agregarse.
- 2.- Los vasos dañados emiten sustancias tisulares que activan el sistema de coagulación, con lo que se refuerza el coágulo plaquetario.
- 3.- La célula endotelial de los vasos contiene un factor anti-trombina y anti-agregación para reducir o prevenir la formación de trombos una vez que la hemorragia está controlada.

ESQUEMA 1

Hemostasia - Coagulación - Fibrinólisis



Papel de las plaquetas en hemostasia. Agentes coagulantes derivados de los megacariocitos, las plaquetas contribuyen al proceso hemostático con las siguientes funciones:

- 1.- Soporte endotelial. Al lado de la herida, las plaquetas vienen a formar parte del subendotelio expuesto.
- 2.- Formación del tapón hemostático via adhesión a colágeno y cohesión de unas con otras.
- 3.- Metamorfosis (formación de pseudópodos) y liberación granular de los factores plaquetarios (ADP, serotonina, trombos-tenina, etc).

Papel del plasma en hemostasia. En el plasma se dan dos mecanismos considerados complementarios, uno suministrando fibrina (coagulación) y otro removiéndola (fibrinólisis).

La coagulación es el resultado de una cadena de reacciones enzimáticas por las cuales una proteína del plasma - fibrinógeno (factor I) -, es transformada en una red de fibrina. El sentido del mecanismo es transformar el tapón plaquetario (hemostasia primaria) en un tapón hemostático estable para el posterior mantenimiento de la hemostasia.

Cada enzima del sistema de coagulación sanguínea tiene un zimógeno (precursor) que se activa por la enzima activa que le precede en la serie. El resultado final es la formación de trombina. La trombina rompe 4 péptidos pequeños de cada molécula de fibrinógeno transformándolo en monómero de fibrina, el cual polimeriza originándose el coágulo sanguíneo.

Los pasos básicos del sistema fueron estudiados hace

75 años por Morawitz (1). En las últimas décadas se han realizado múltiples trabajos referentes al tema, aún así, ha sido recientemente cuando se ha reunido suficiente información para dilucidar el mecanismo molecular que tiene lugar durante la activación de las enzimas de coagulación. Casi todos los factores se han descubierto mediante estudios en individuos o familias con deficiencias genéticas en los cuales la ausencia de una enzima particular causa anormalidades en el sistema de coagulación. En las Tablas I y II vienen indicados los factores de coagulación así como su naturaleza y concentración en plasma. En el esquema n° 2 viene representado el mecanismo en cascada de los factores. Este mecanismo es considerado como un amplificador biológico, con una serie de mecanismos de retroalimentación positiva y negativa para modular la ganancia de la amplificación.

Como puede observarse existen dos vías de activación: vía extrínseca (factores tisulares) y vía intrínseca (factores plasmáticos); que convergen en el factor Stuart para seguir una vía común hasta la formación de trombina. Como ya se dijo, la trombina es la responsable de la formación de fibrina. En el esquema n° 3 está representado este último paso de la coagulación.

El factor XIII o factor estabilizante, es una transaminasa que va a formar uniones ϵ -(γ -glutamil)lisina entre las cadenas γ - γ y α - α del fibrinógeno, originándose una fibrina estable y difícilmente disociable.

El otro mecanismo hemostático que acontece en el plas-

TABLA 1

Factores de coagulación

Factores	Sinónimos	Tipo de proteína
I	Fibrinógeno	Fibrina-funcional
II	Protrombina	Precursor de serino- proteasa
III	Tromboplastina tisular	Liso-proteína
IV	Calcio	Catión
V	Proacelerina	Co-factor (F. Xa)
VI	Sin asignar	
VII	Proconvertina	Precursor de proteinasa
VIII	F. antihemofílico	Precursor de serino-pro- teasa. Co-factor (F. IX)
IX	F. Christmas o tromboplastina plasmática	Precursor de serino- proteasa
X	F. Stuart	Precursor de serino- proteasa
XI	Antecedente de la tromboplastina del plasma (PTA)	Precursor de serino- proteasa
XII	F. Hageman	Precursor de serino- proteasa
XIII	Factor estabilizan- te de fibrina (FSF)	Precursor de transamidasa
Precalicroina	F. Fletcher	Precursor de serino-proteasa
Quinínogeno de alto p.m.	F. Fitzgerald	Co-factor

TABLA II
Factores de coagulación

1. FACTORES DEPENDIENTES DE VITAMINA K

Factor	Peso molecular		Concentración en plasma (1 ml)
	Precursor	Forma activa	
II	72.000	38.000	200 µg
VII	45.000		2 µg
IX	57.400	46.500	3-4 µg
X	55.000	44.000	6-8 µg

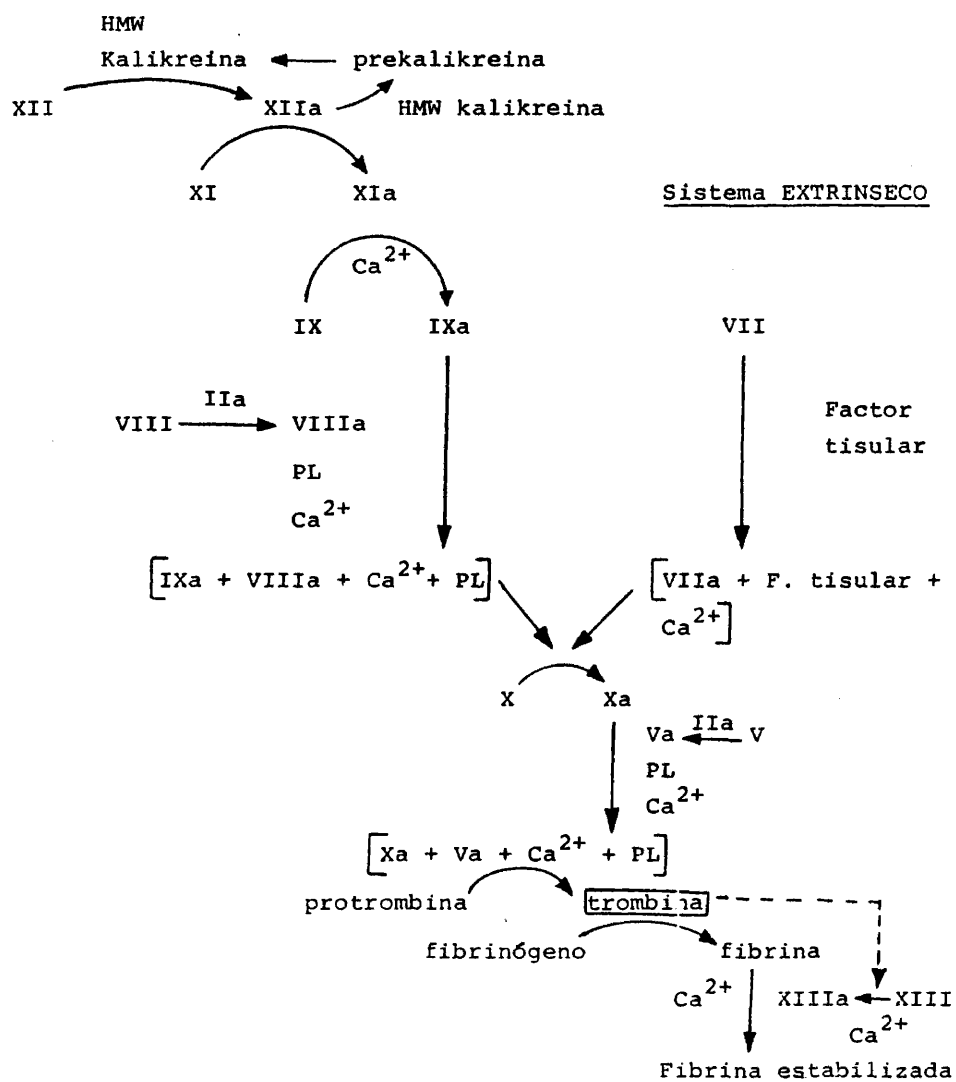
2. FACTORES SENSIBLES A TROMBINA

I	340.000	330.000	2-3 µg
V	690.000		
VIII			10 µg
XIII	320.000	140.000	

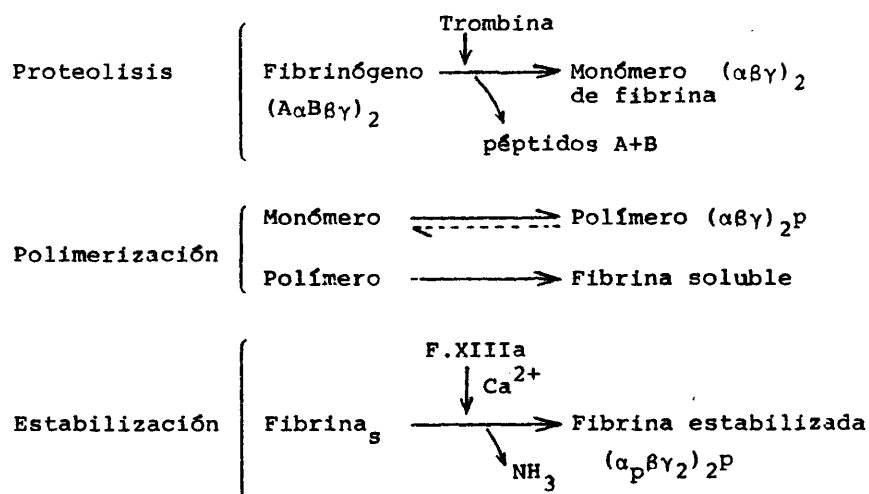
3. FACTORES DE CONTACTO

XI	124.000	16.000	7 µg
XII	75.000	75.000	40 µg
F.Fitzgerald	120.000		80 µg
F.Fletcher	107.000	107.000	20-40 µg

Sistema INTRINSECO



ESQUEMA 3

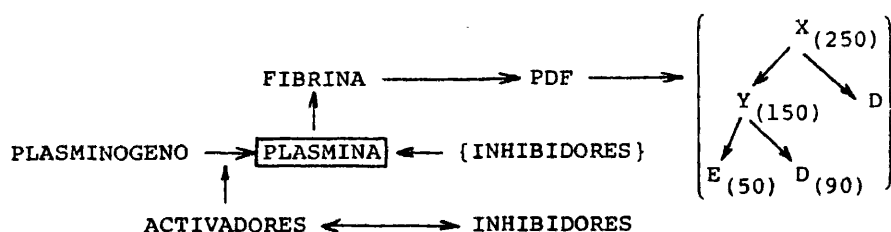


ma y que es complementario al de coagulación es la fibrinolisis.

La Fibrinolisis es la disolución de la fase sólida de fibrina en unos productos solubles denominados PDF (productos de degradación de la fibrina). La fibrina se disuelve de varias maneras, pero el término fibrinolisis se refiere a la disolución enzimática mediada por el sistema fibrinolítico (en la segunda parte de esta introducción se estudiará con detalle dicho sistema), cuyos componentes son: la enzima plasmina, su zimógeno plasminógeno, los activadores y los inhibidores.

La cadena de reacciones que conducen a la fibrinolisis es un ejemplo de un principio general en el organismo: una regulación basada en: a) activación a través de proteólisis limi-

ESQUEMA 4



tada por activadores específicos pro-enzimáticos, y b) unión de la enzima activa a inhibidores (Esquema n° 4).

El mecanismo fibrinolítico tiene la función fisiológica de limitar la persistencia de la fibrina a las necesidades hemostáticas del organismo.

Una vez vistos en líneas generales los componentes estructurales del mecanismo hemostático: sistema vascular y plaquetario (hemostasia primaria) y plasma (coagulación y fibrinólisis), vamos a ver como éstos interaccionan entre sí y analizar los aspectos DINAMICOS de la hemostasia para llegar a lo que se ha denominado: Equilibrio trombo-hemorrágico.

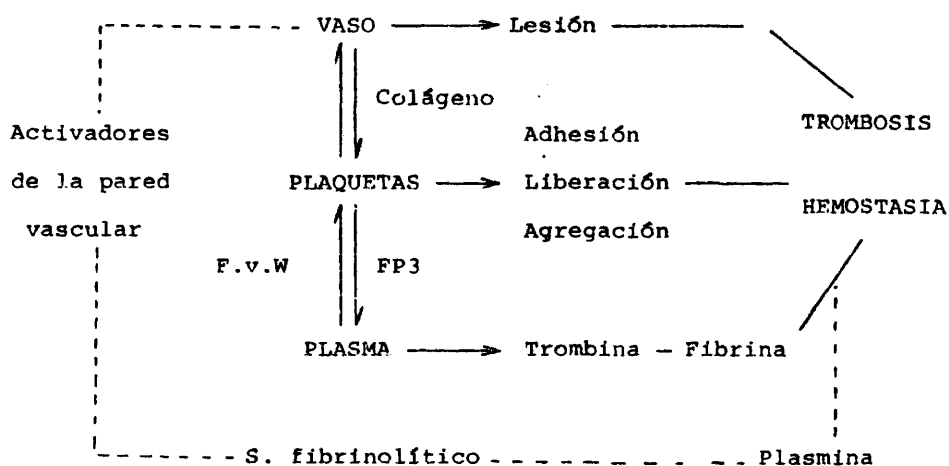
Astrup (2) fué el primero que introdujo el término equilibrio hemostático, refiriéndose principalmente al equilibrio entre coagulación y fibrinólisis. Inherente a este concepto estaba el hecho de que una lenta pero constante coagulación intravascular ocurre en el organismo y que la fibrina así formada es continuamente eliminada por el sistema fibrinolítico. El concepto fué revisado por Hjort y Hasselback (3) en 1961, llegando a la conclusión de que "la teoría de la hemostasia con

tínua no puede ser aceptada ni rechazada por falta de información". Observaciones hechas desde este año indican que existe un mecanismo más extenso al que Stormaken ha denominado equilibrio trombo-hemorrágico (4).

Vamos a ver primero las bases teóricas de este concepto y posteriormente analizar la evidencia reciente que lo apoya.

La interacción esencial entre los principales componentes del mecanismo hemostático: la pared vascular, las plaquetas y el plasma; viene ilustrada en el esquema n° 5.

ESQUEMA 5

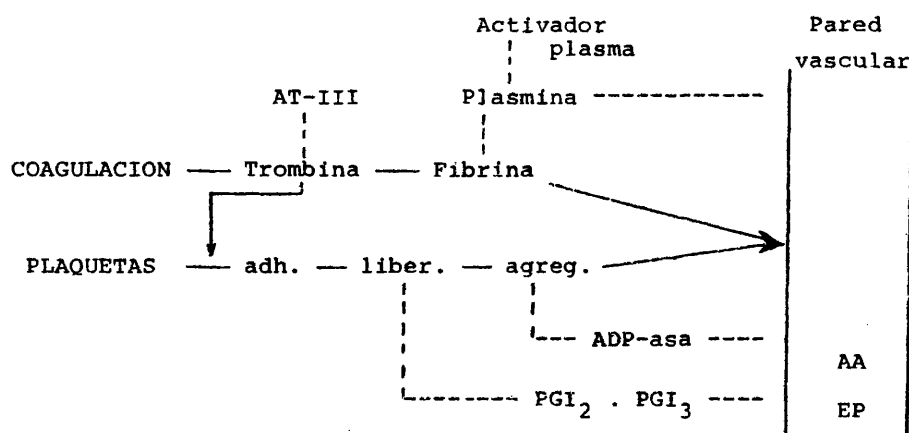


Los vasos suministran el sustrato necesario para la adhesión de las plaquetas, representado por el colágeno, las plaquetas a su vez suministran el factor plaquetario 3 (FP3), que es necesario para el proceso intrínseco de coagulación, el plasma suministra el factor v. Willebrand (F.v.W.) que es necesario para que las plaquetas se adhieran a la pared vascular. Por otro lado, el activador más importante del plasminógeno es el activador de la pared vascular que es liberado a la sangre por una señal procedente o de la trombina o de otros productos del mecanismo de coagulación. Así pues, tenemos que el equilibrio es un mecanismo de retroalimentación con la formación de fibrina estimulando la liberación del activador fibrinolítico.

Estudios recientes demuestran también que existe un mecanismo de defensa contra la adhesión/agregación plaquetaria a la pared vascular. Este mecanismo aún no está esclarecido del todo, pero se piensa que del sistema de prostaglandinas de la pared vascular, proceden compuestos anti-agregantes y vasodilatadores (5). La prostaciclina (PGI_2) se forma del ácido araquidónico (AA) y la prostaciclina (PGI_3) del ácido eicosapentanoico (EP), ambas agentes anti-agregantes (6). A la vez se producen ADP-asas que rompen el ADP liberado, inhibiendo así la posterior propagación del proceso (7, 8). Está claro, que la hemostasia normal depende del estado de cada uno de los componentes, según se indica en el esquema n° 6.

Una hiperactividad del mecanismo de coagulación o de las plaquetas (\downarrow) o funciones deficientes del sistema fibri-

ESQUEMA 6



nolítico o del mecanismo de defensa de la pared vascular (---), conducirán a estados trombóticos y una situación opuesta conducirá a estados hemorrágicos.

Hay que tener presente el hecho de que no solamente existe un equilibrio entre los principales componentes del mecanismo, sino que también existe un equilibrio entre los elementos de cada uno de los componentes entre sí.

En el mecanismo de coagulación el factor principal de equilibrio es el inhibidor Antitrombina III que actúa principalmente sobre trombina y factor X_a, su actividad está acelerada por la heparina. Por otra parte, la trombina también activa o desactiva a los factores VIII y V e influye en el comportamiento plaquetario. El sistema fibrinolítico muestra un equilibrio similar, existen los inhibidores a nivel de activación y tam-

bién existe un eficiente mecanismo por parte del inhibidor antiplasmina en la neutralización de la plasmina.

A nivel plaquetario, el equilibrio es muy frágil pues se requiere el funcionamiento adecuado de muchos procesos separados para lograr una hemostasia normal. Entre ellos están: el estado de las moléculas de colágeno, el estado de los receptores de la membrana plaquetaria (ej. síndrome de Bernard-Soulier y trombastenia), liberación/activación de fosfolipasa A₂, la composición y disponibilidad de fosfolípidos de membrana, la liberación del ácido araquidónico, el funcionamiento de ciclo oxigenasa en la formación de prostaglandina G₂ (PGG₂) y de tromboxano sintetasa en la producción de tromboxano A₂ (TXA₂), almacenamiento de ADP, etc.

Hasta ahora, solamente se han identificado deficiencias en colágeno, receptores de membrana, ciclo oxigenasa y almacenamiento de ADP como causantes de desórdenes hemorrágicos. Las posibilidades de que el mecanismo sea hiperactivo y por consiguiente trombogénico son múltiples.

Por último, en esta primera parte de la introducción vamos a ver la evidencia que existe sobre la existencia de este equilibrio trombo-hemorrágico, lo cual nos permite abordar el tema de la hemostasia en su ASPECTO PATOLOGICO.

A nivel de la interacción pared vascular-plaquetas , existen pacientes con trombosis recurrentes que poseen colágeno hiperactivo (9), indicando así el papel de la pared vascular en la trombosis venosa. Esto se apoya también con los casos descri

tos de pacientes con tendencias hemorrágicas que poseen colágeno hiperactivo (10).

Factores tales como hiperlipemia, presión sanguínea, tabaco y diabetes, están íntimamente conectados con el desarrollo de aterosclerosis, por lo que se conocen como factores de riesgo de contraer estas enfermedades cardiovasculares, aunque no existe un acuerdo unánime sobre su patogénesis. Sin embargo, hay evidencia de que el primer acontecimiento es una lesión endotelial que puede conducir a la perturbación del mecanismo de defensa de la pared vascular y consecuentemente permitir la deposición de plaquetas y fibrina.

En homocistinuria hay un daño endotelial muy pronunciado con alta incidencia en aterosclerosis (11). En la enfermedad de Tangier (deficiencia de lipoproteínas de alta densidad - HDL -), hay una gran incidencia de aterosclerosis y se ha demostrado en cultivos de células endoteliales que la HDL protege a las células de daños (12).

El tabaco incrementa el número de células endoteliales circulantes; el tabaco también causa hiperfunción plaquetaria y hay evidencia de su asociación con producción de TXA_2 (13, 14).

En diabetes, que es bien conocida por sus complicaciones ateroscleróticas, hay una hiperfunción plaquetaria y un incremento en la síntesis de TXA_2 (15); experimentalmente se ha visto que el aumento de TXA_2 produce una disminución en la producción de PGI_2 por las arterias (16).

Hay por lo tanto suficientes datos para afirmar que el primer efecto de los factores de riesgo es inducir lesiones en la zona endotelial. El modo en que estas lesiones se producen se desconoce, pero la posibilidad de que los factores de riesgo perturben el metabolismo normal de la pared vascular y de las plaquetas, para influir en la coagulación y fibrinólisis, parece evidente. A nivel de coagulación sanguínea, el mejor indicio es la relación que existe entre trombosis venosa y la deficiencia de Antitrombina III (17), una reducción de un 50% de ésta, está asociado con una clara tendencia trombótica. Se han descrito ejemplos de anomalías congénitas en las que hay un incremento en la producción de factor VIII o factor V, y que están asociadas con un incremento de las tendencias trombóticas (18). Egeberg (19) describió un caso de una familia con un fibrinógeno hipercoagulable que presentaba tendencias trombóticas. En la Tabla III vienen indicados algunos de los ejemplos mencionados de alteraciones en la coagulación con tendencias a trombosis.

La ingestión de estrógenos (ej. píldoras anticonceptivas), produce un incremento en los factores indicados en la tabla, pero una disminución en la Antitrombina III. Las investigaciones epidemiológicas han demostrado claramente una tendencia aumentada no sólo a la trombosis venosa sino también arterial (20).

Con relación a los grupos sanguíneos, el grupo A presenta un perfil trombótico con incremento en los factores VIII:c, VIII:AG y V pero disminución en antitrombina; mientras

TABLA III

Alteraciones en la coagulación con tendencia
a la trombosis.

-
- Disminución de la inhibición: deficiencias de Antitrombina
 - Incremento de la actividad procoagulante:
 - Aumento congénito del factor VIII:c
 - Aumento congénito del factor V
 - Fibrinógeno hipercoagulable
 - Estrógenos (factor II, VII, X, VIII)↑
 - Antitrombina III ↓
 - Grupos sanguíneos:
 - A - (factor VIII:c, VIII:AG, V)↑
 - Antitrombina III ↓
 - O - (factor VIII:c, VIII:AG, V)↓
 - Antitrombina III ↑
-

que el grupo O presenta el perfil opuesto (21, 22). Investigaciones epidemiológicas muestran claramente que el grupo A es propenso a trombosis venosa y arterial, mientras que el grupo O es propenso a hemorragias.

En relación con la fibrinólisis, el defecto más común es probablemente la falta o la deficiencia en la liberación del activador de la pared vascular. De acuerdo con Isacson y Nillson (23), ésta es la causa más frecuente de trombosis recurrente. También se han encontrado otras perturbaciones (Tabla IV) tales como, un incremento en el inhibidor fibrinolítico (24) ,

TABLA IV

Alteraciones en el sistema fibrinolítico
con tendencias a estados trombóticos o
hemorrágicos.

TROMBOSIS - Deficiencia del activador de la pared vascular
Aumento del inhibidor fibrinolítico
Deficiencia de plasminógeno
Plasminógeno anormal
HEMORRAGIA - Deficiencia de α_2 -antiplasmina

deficiencia de plasminógeno o plasminógeno anormal (25) y un pa-
ciente con deficiencias congénitas de α_2 -antiplasmina (26), mos-
trando una enfermedad hemorrágica semejante a la hemofilia.

Estas observaciones indican claramente la importancia
del sistema fibrinolítico como mecanismo de defensa contra la
trombosis venosa. Sin embargo, la importancia del sistema en
la trombosis arterial no es tan evidente; así, en diabetes (27)
y en pacientes hiperlipémicos en que el potencial fibrinolítico
está reducido, el papel que éste juega en el desarrollo de la
trombosis arterial y aterosclerosis no se conoce (28).

La investigación de este problema es urgente pues mu-
chos investigadores han observado infarto miocárdico y episo-
dios arterio-cerebrales en gente joven con actividad fibrinolí-
tica disminuida. En un estudio reciente Mettinger (29) encontró
insuficiencia fibrinolítica en 70% de 52 pacientes con desórde-
nes isquémicos cerebro-vasculares.

A continuación se van a exponer diversos aspectos químico-físicos del sistema fibrinolítico; tanto de sus componentes como de su mecanismo de acción, para llegar a establecer los problemas que aún permanecen sin resolver sobre el mismo, y plantear lo que se ha pretendido en el presente trabajo.

I.2.- SISTEMA FIBRINOLITICO

El sistema fibrinolítico es el sistema enzimático capaz de disolver coágulos de sangre en mamíferos. Su papel no es sólo el de eliminar fibrina del lecho vascular sino que también está implicado en otros fenómenos biológicos tales como: reparación de tejidos (30), transformaciones malignas (31), función macrofaga (31), ovulación (32). Aquí se tratará del sistema en trombolisis.

Observaciones de licuefacción de sangre coagulada y del incremento de fibrinolisis in vitro e in vivo, se remontan al siglo XVIII y XIX. La mayor parte de los componentes del sistema fibrinolítico (Tabla V) han sido identificados entre 1930 y 1950; Astrup (33) y Fearly (34) han hecho una revisión sobre tales hallazgos.

En 1941, Milstone (35) mostró que la lisis de la fibrina por la sustancia estreptocócica descrita por Tillet y Garner (36) en 1933, dependía de un "factor" lítico presente en el suero humano y Kaplan (37) y Christensen (38) encontraron que este factor lítico era un precursor enzimático que se convertía a enzima activa por el fluido bacteriano. Al precursor se le llamó

TABLA V

Componentes del sistema fibrinolítico

- Plasminógeno	Proenzima de la enzima fibrinolítica.
- Plasmina	Enzima fibrinolítica activa.
- Activador tisular del plasminógeno	Enzima presente en tejidos que convier <u>te</u> el plasminógeno en plasmina.
- Activador vascular del plasminógeno	Activador del plasminógeno presente en las células endoteliales.
- Activador vascular en sangre	Activador del plasminógeno presente en sangre.
- Estreptoquinasa	Proteína estreptocócica que activa el sistema fibrinolítico en plasma humano.
- Uroquinasa	Activador del plasminógeno procedente de orina o cultivos celulares de riñón.
- Factor Hageman	
- Cofactor del factor Hageman	
- Quininógeno de alto peso molecular	Proteínas del plasma implicadas en la activación intrínseca del plasminógeno.
- Precalicroina	
- Antiactivadores	Designación general para los inhibidores de la activación del plasminógeno.
- Antiplasminas	Designación general para los inhibidores de plasmina.

plasminógeno, a la enzima plasmina y al factor estreptocócico estreptoquinasa (39).

En 1947, Astrup y Permin (40), vieron que los tejidos de animales contienen un agente que puede activar al plasminógeno, este factor fué originalmente llamado fibrinoquinasa. MacFarlane y Pilling (41) encontraron actividad fibrinolítica en orina y Williams (42) demostró que esto era debido a la presencia de un activador del plasminógeno que actualmente se denomina uroquinasa.

El origen de la actividad fibrinolítica en sangre ha sido muy debatido, el agente fibrinolítico presente en sangre parece proceder del endotelio vascular, por lo que se le ha denominado activador vascular del plasminógeno (43). Hay evidencia de que los activadores de la pared vascular y de los tejidos son similares o idénticos, pero que son diferentes a la uroquinasa (44, 45). Alternativamente, actividad activadora del plasminógeno se puede provocar en la sangre vía activación del factor Hageman (46). Esta activación humoral del plasminógeno requiere la presencia de otras proteínas. Se ha identificado una ruta que requiere factor Hageman, kininógeno de alto peso molecular, prekalikreina y activación de contacto (47, 48, 49).

En 1947, se vió que la sangre contiene sustancias que inhiben el proceso fibrinolítico. Los inhibidores de plasmina se denominan antiplasminas y los inhibidores de la activación del plasminógeno antiactivadores. Inhibidores de la activación del plasminógeno hay varios en el plasma; el C1-inactivador, principal inhibidor de la ruta intrínseca (50) antitrombina III,

que en presencia de heparina inactiva el factor Hageman (51), la α_2 -macroglobulina que inhibe a la kalikreina y por lo tanto puede jugar un papel en la regulación de la fibrinólisis intrínseca (52). En el plasma también están presentes inhibidores del activador vascular; el conocimiento de estos inhibidores es aún muy primario debido a que los métodos utilizados para su detección son sensibles a los inhibidores de plasmina (53, 54). Los inhibidores de plasmina son: la α_2 -macroglobulina que reacciona lentamente con plasmina y sirve como inhibidor secundario (59), y la α_2 -antiplasmina, inactivador fisiológico más importante descubierto por cuatro grupos independientes (55, 56, 57, 58).

Plasminógeno.- El plasminógeno humano, presente en plasma a concentración 1,5 - 2,0 μ M, es una glicoproteína de cadena sencilla de peso molecular 90.000 que contiene un 2% de carbohidrato. La secuencia primaria de la molécula ha sido dilucidada por Magnusson, Wallen y Wiman (60, 61, 62, 63). Consta de 790-791 aminoácidos y 24 puentes disulfuro (Figura 1).

El plasminógeno nativo tiene ácido glutámico como NH_2 -terminal, por lo que se le denomina Glu-plasminógeno. Por digestión plásmica limitada se convierte en formas modificadas con lisina, metionina o valina como NH_2 -terminal, denominándose Lys-plasminógeno (64, 65). Esta conversión ocurre por hidrólisis de las uniones peptídicas: Arg_{67} - Met_{68} , Lys_{76} - Lys_{77} o Lys_{77} - Val_{78} .

El plasminógeno contiene tres regiones diferentes estructural y funcionalmente (66, 67):

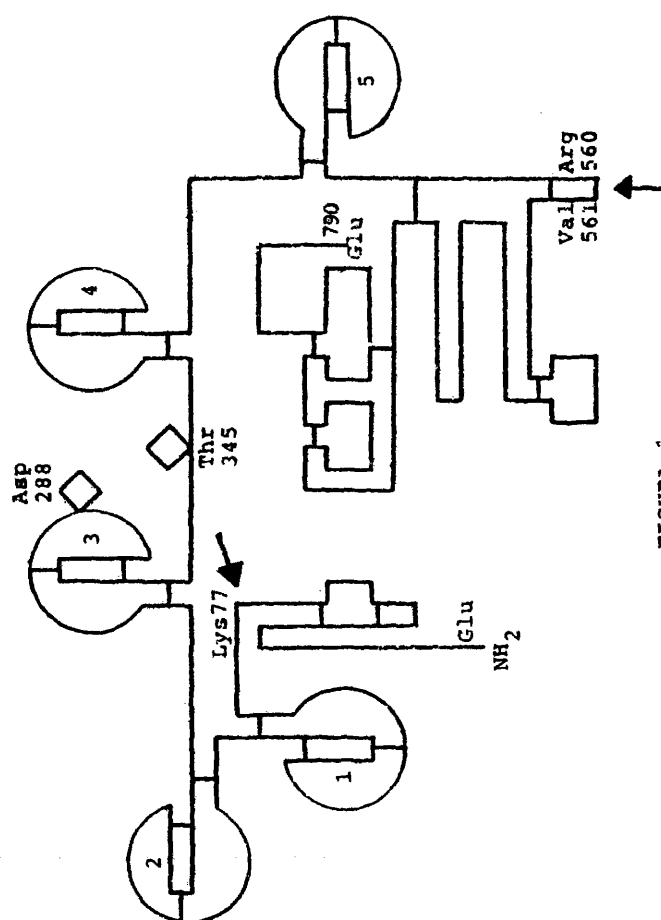


FIGURA 1

Estructura del plasminógeno humano

- 1.- La región N-terminal (residuos 1-82). Parte de ella (residuo 1-76) se separa cuando el plasminógeno nativo se convierte en Lys-plasminógeno; por ejemplo durante activación.
- 2.- La región de la cadena polipeptídica que después de la activación se transforma en la cadena pesada (A) de plasmina (residuos 77-560). De acuerdo con el modelo de Magnusson (60), contiene 5 estructuras denominadas "bucles", en forma de lazos estabilizados por tres puentes disulfuro.
- 3.- La región de la cadena polipeptídica que después de la activación se transforma en la cadena ligera (B) de plasmina (residuos 561-790). Este segmento contiene el centro activo de la enzima.

La región N-terminal, según Wiman y Wallen (68), contiene el heptapéptido de secuencia: -Ala₄₄-Phe-Glu-Tyr-His-Ser-Lys₅₀-, que tiene afinidad por otra porción de la cadena polipeptídica. Esta interacción molecular confiere al plasminógeno su estructura relativamente compacta. Esta región también contiene un lazo ácido: -Cys₃₄-Glu-Glu-Asp-Glu-Glu-Phe-Thr-Cys₄₂-, formado por un puente disulfuro entre los dos residuos cisteína.

La siguiente región, residuos 77-560, que contiene las 5 estructuras homólogas o bucles que contienen los denominados sitios de unión a Lys (69, 70). El primer bucle posee dos lugares, el 2°, 3° y 4°, un lugar cada uno y el 5° carece de ellos. „ Estos sitios se unen a ácidos ω -amino carboxílicos. El efecto funcional de los ácidos varía con la distancia entre el grupo ω -amino y el grupo α -carboxílico (d), siendo el máximo valor de

0,7 nm y el óptimo probablemente de 0,567 nm. En el ϵ -amino caproico $d=0,60$ nm, y en el tranexámico $d=0,58$ nm (71).

Estos lugares son de especial interés pues a través de ellos el plasminógeno (plasmina) probablemente se une tanto a la α_2 -antiplasmina como a la fibrina (72). Esta facultad del plasminógeno de unirse a la lisina se utiliza para su purificación, que se realiza por cromatografía de afinidad en lisina insoluble según el método introducido por Deutch y Mertz (73).

El Glu-plasminógeno en sangre humana, presenta una microheterogeneidad llegándose a obtener de un mismo plasma hasta 12 formas moleculares distintas, se cree que originadas por diferencias en la composición de aminoácidos y carbohidratos (especialmente del contenido en ácido siálico) (74, 75).

Las propiedades hidrodinámicas del plasminógeno vienen expresadas en la Tabla VI.

La activación del plasminógeno a plasmina tiene un papel clave en el proceso fibrinolítico. A nivel fisiológico, la activación del plasminógeno puede ocurrir de tres modos distintos, como se indica en el esquema n° 7.

La fibrinólisis intrínseca, recientemente revisada (77, 78), puede ocurrir por una o más vías que incluyen el factor XII (factor Hageman), prekalikreína (factor Fletcher), kininógeno de alto peso molecular (factor Fitzgerald) y posiblemente otros componentes. El mecanismo exacto de su activación, así como su papel biológico, permanecen aún desconocidos. Varios inhibidores de esta activación están presentes en plasma: C1-inactivador (50), un inhibidor del factor XII (79, 80), el

TABLA VI

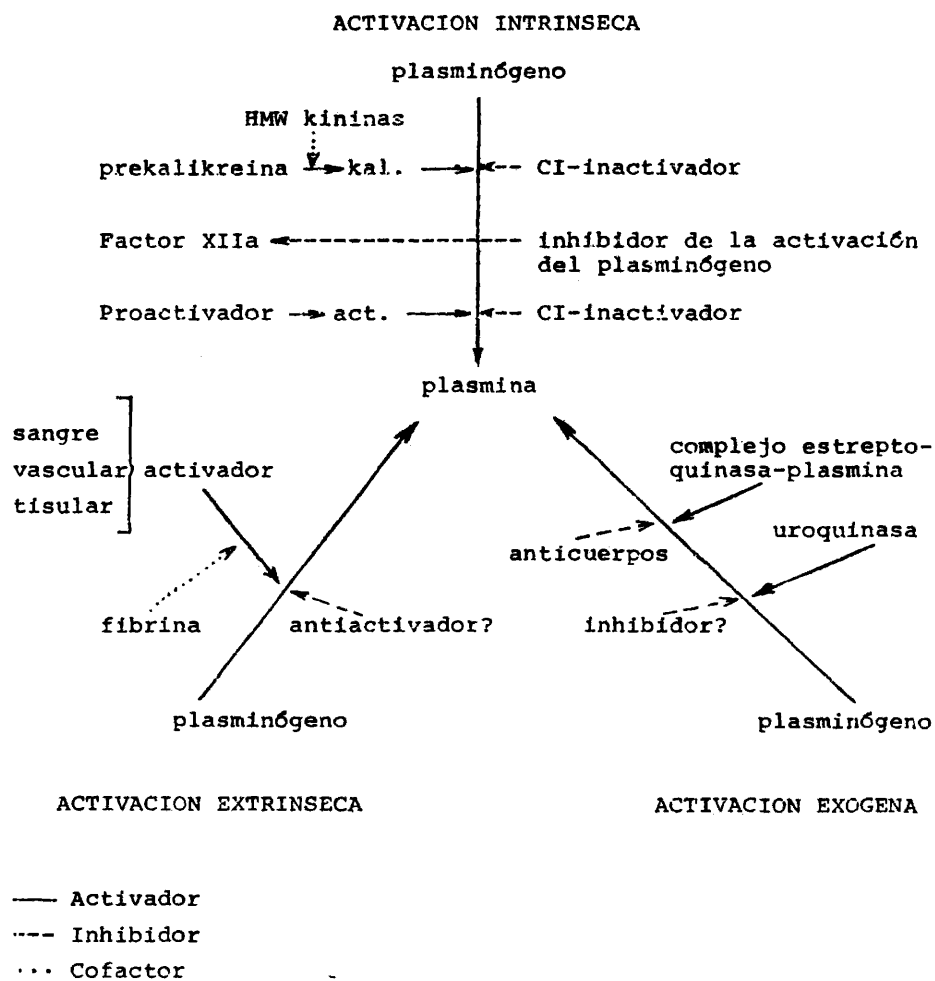
Propiedades hidrodinámicas y pesos moleculares de Glu-plasminógeno y Lys-plasminógeno según Sjöholm (76) y Wallen y Wiman (64).

Los pesos moleculares se determinaron: (A) SDS-PAGE, (B) equilibrio de sedimentación y (C) filtración en gel.

	Peso molecular			Constante de sedimentación	Volumen específico parcial. ml/mg
	A	B	C		
Glu-plasminógeno	93.000	92.000	90.000	5,10	0,706
Lys-plasminógeno	86.000	90.000	105.000	4,80	0,709

ESQUEMA 7

Representación esquemática de las vías de activación del plasminógeno (—) y lugar de acción de los inhibidores (---)



complejo heparina-antitrombina III (51) y la α_2 -macroglobulina (52).

La ruta extrínseca la llevan a cabo activadores tisulares, vasculares y plasmáticos. En muchos órganos, tejidos y secreciones, existen activadores del plasminógeno (81), tales como en corazón de cerdo (82, 83, 84) y útero humano (85). Estos activadores parecen ser serino proteasas de peso molecular 60.000. También se ha purificado parcialmente un activador del plasminógeno procedente de la sangre después del ejercicio (86). Parece que los activadores encontrados en la sangre son activadores vasculares liberados a la misma, ya que estos activadores son similares o idénticos a los activadores tisulares. Una importante propiedad del tipo de activador plasmático-vascular-tisular es su gran afinidad por la fibrina. La presencia en plasma de inhibidores de estos activadores extrínsecos se postuló en 1950, y en estudios recientes se ha vuelto a considerar (87), pero la existencia de un inhibidor específico de estos activadores aún no se ha demostrado (54).

La activación exógena del plasminógeno se realiza con estreptoquinasa y uroquinasa. La uroquinasa es una proteasa del tipo tripsina, procedente de orina humana y de células embrionarias de riñón humano. Puede presentarse en dos formas moleculares; S_1 de peso molecular 31.600 y S_2 de 54.000. La uroquinasa se diferencia del activador vascular o tisular en sus propiedades antigénicas (81) y en su especificidad enzimática (88). ”

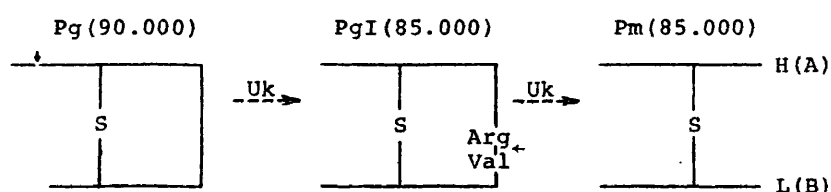
La estreptoquinasa es una proteína no enzimática de peso molecular 47.000 producida por un estreptococo β -hemolítico

que activa el sistema fibrinolítico de manera indirecta (89). Las propiedades y mecanismo de acción de la estreptoquinasa han sido revisados en detalle (90). Por el momento la estreptoquinasa es el agente trombolítico más ampliamente usado, pues es barato y fácil de obtener, pero todavía no se han establecido las dosis óptimas y el lugar exacto de administración en desórdenes trombo-embólicos (91).

La inhibición de esta activación exógena no es muy conocida en el caso de la uroquinasa; con respecto a la estreptoquinasa hay que mencionar que el plasma humano contiene anticuerpos contra ella y que al reaccionar la hacen bioquímicamente inerte.

A nivel molecular, según Wiman y Wallen (92), la activación del Glu-plasminógeno sucede en dos pasos: liberación de un péptido en la zona NH_2 -terminal, tras ruptura de la unión $\text{Arg}_{67}\text{-Met}_{68}$, originando Lys-plasminógeno, seguido de la ruptura de la unión $\text{Arg}_{560}\text{-Val}_{561}$, dando lugar a dos cadenas unidas entre sí por un enlace disulfuro. Sin embargo, la activación del Glu-plasminógeno en presencia del inhibidor fisiológico α_2 -antiplasmina, da lugar a Glu-plasmina (93).

Actualmente el mecanismo de activación del plasminógeno "in vivo" no se conoce con exactitud. Según Gaffney (94), la uroquinasa actúa directamente sobre la molécula de plasminógeno según el siguiente modelo:



Sin embargo, la estreptoquinasa no posee actividad proteasa o esterasa, pero cuando se pone en contacto con plasminógeno o plasmina, en la relación estequiométrica 1:1, se forma el complejo estreptoquinasa-plasminógeno o plasmina con un centro activo en la molécula de plasminógeno o plasmina capaz de actuar como activador de una nueva molécula de plasminógeno.

La cinética de activación del plasminógeno humano por uroquinasa o por el complejo estreptoquinasa-plasminógeno, ha sido estudiada por varios autores, pero más extensamente por Christensen y Wohl (95, 96). La activación sigue una cinética de Michaelis-Menten con valores de $K_M = 1,40 \mu M$ y K_{Ca} de 0,26 a $26 s^{-1}$. Como resultado de tal activación se origina plasmina.

La plasmina (EC 3.4.21.7) es la enzima clave del sistema fibrinolítico. Enzima del tipo tripsina, posee una amplia especificidad, pero in vivo su acción está prácticamente limitada a la fibrina, rompiendo uniones lisina o arginina. Como resultado de su acción se originan los productos de degradación de fibrina (PDF).

La plasmina posee un peso molecular de 85.000 y consta de una cadena pesada o cadena A (65.000) en la que están localizados los 5 bucles o estructuras homólogas; y una cadena

ligeras o cadenas B (25.000) que contiene el centro activo o catalítico. Ambas cadenas están unidas por dos puentes disulfuro. En ciertas condiciones reductoras, dichos puentes se pueden romper y separarse las cadenas por cromatografía de afinidad en lisina-sefaroza que absorbe especialmente la cadena A pero no la B.

La plasmina pertenece al grupo de enzimas denominadas serina proteasas (ver Tabla VII).

La cadena B presenta una gran homología con las serina proteasas pancreáticas (97) y también con las correspondientes cadenas de trombina (98) y factor X_a (99). El centro catalítico está formado por: His₆₀₆, Asp₆₄₆ y Ser₇₄₁. Como en el resto de las serina proteasas existe una "cavidad de unión" con un resto aspártico (residuo 735) cuya función es orientar al sustrato hacia la enzima (100). Las serina proteasas además de estas "cavidades" poseen otros lugares de unión con el sustrato, pues es ventajoso tener acoplado un centro catalítico eficiente con unos requisitos de unión altamente selectivos. En el caso de la plasmina, estos lugares de unión están localizados en las estructuras en triple lazo de la cadena A, en los denominados lugares o sitios de unión a lisina (101). Parece que restos His₃₁ y Asp₅₄ participan en la estructura primaria de dichos lugares (102).

La acción de la plasmina en la fibrinólisis está inhibida por los inhibidores denominados antiplasminas, entre los que se encuentran la α_2 -macroglobulina y la α_2 -antiplasmina. Las revisiones que han aparecido sobre la bioquímica y la

TABLA VII

Serina proteasas

Enzima	Procedencia	Función	Ruptura de unión peptídica
Tripsina	Pancreas	Digestión de proteínas.	Arg-X o Lys-X
Quimotripsina	Pancreas	Digestión de proteínas.	hidrofóbicas-X
Elastasa	Pancreas	Digestión de elastasa.	Ala-X o Gly-X
Trombina	Suero	Fibrinolisis	Arg-Gly en fibrinógeno
Plasmina	Suero	Fibrinolisis	Arg-X o Lys-X en fibrinógeno
Calicreina	Tejidos y fluidos	Generación de kininas.	Arg-X
C1 del complemento	Suero	Lisis de células en reacción inmune.	Arg-X
Cocoonasa	Larva	Disolución del capullo en metamorfosis.	
Proteasa acrosomal	Acrosoma de esperma	Penetración de zona pelucida del huevo.	Arg-X o Lys-X
Tripsina bacterial	<u>Streptomices griseus</u>		Arg-X o Lys-X

fisiología de la α_2 -macroglobulina coinciden en señalar un papel secundario comparado con el que se ha considerado el inhibidor más potente de la fibrinólisis: la α_2 -antiplasmina.

La α_2 -antiplasmina es una glicoproteína de peso molecular 70.000; presente en plasma a concentración 1 μ M, forma un complejo estequiométrico muy estable con plasmina inactivándola de su capacidad proteasa o esterasa. La formación del complejo se realiza a través de una fuerte interacción entre la cadena B de la plasmina y el inhibidor; ver Figura 2.

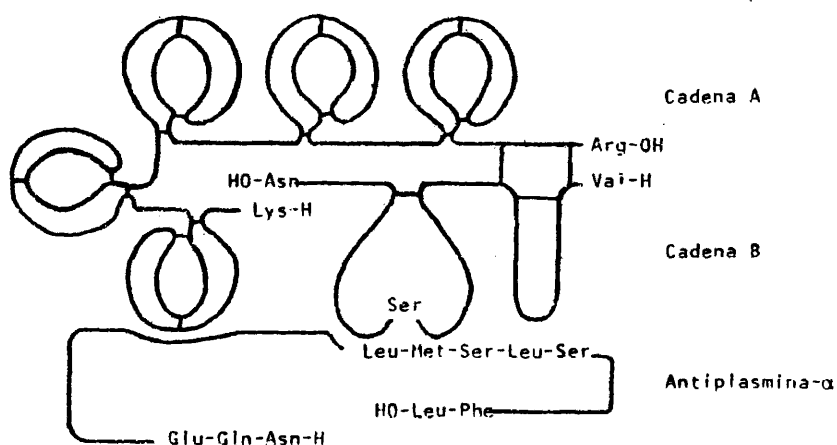


FIGURA 2

Representación de la interacción entre plasmina y α_2 -antiplasmina

Así como la estructura del plasminógeno, plasmina y de otros de los componentes del sistema fibrinolítico, está bastante esclarecida; no sucede lo mismo con otros aspectos del sistema. A nivel fisiológico se desconoce aún el mecanismo específico de adsorción de los elementos del sistema al coágulo de fibrina. Problema que a pesar de su enorme importancia, con miras a una terapia o profilaxis, aún no ha sido resuelto. Actualmente existen varias hipótesis sobre el mecanismo fisiológico de la fibrinólisis.

Mullert y Astrup (33) propusieron el siguiente mecanismo de fibrinólisis: el activador está presente a bajas concentraciones unido al inhibidor en la sangre circulante; pero es adsorbido y se acumula sobre la superficie de la fibrina. Como resultado de esta adsorción del activador y la plasmina a la fibrina, el efecto de los inhibidores sobre la plasmina y sobre la activación está disminuido. Por lo tanto, la activación del plasminógeno tiene lugar en la superficie de la fibrina. La fibrina es lisada y el activador y la plasmina son liberados uniéndose a sus respectivos inhibidores.

Alkjaersig, Fletcher y Sherry (103) propusieron que el plasminógeno es adsorbido a la fibrina polimerizada y convertido a enzima activa por los activadores que difunden dentro del trombo. Así, la plasmina formada realizará su acción en un medio relativamente libre de inhibidores.

Ambrus y Markus (104) propusieron que los complejos plasmina inhibidor formados en la circulación se disocian en la presencia de fibrina, pues la plasmina tiene una mayor afi-

nidad por la fibrina que por sus inhibidores.

Chesterman, Allington y Sharp (103), sugirieron que los activadores se unen selectivamente a la fibrina y transforman el plasminógeno que difunde dentro del trombo a plasmina.

Collen (106), últimamente ha propuesto un mecanismo fibrinolítico basado en las interacciones moleculares observadas "in vitro" que viene esquematizado en el Esquema 8. La base del mecanismo reside en las interacciones entre plasminógeno (plasmina), fibrinógeno, fibrina y α_2 -antiplasmina.

Bases bioquímicas para una terapia trombolítica:

De lo expuesto anteriormente se deduce que:

- La trombolisis requiere la adsorción del activador y del plasminógeno a la superficie de la fibrina y la generación de plasmina "in loco", fuera del alcance del inhibidor.
- El sistema fibrinolítico puede ser activado hasta que la α_2 -antiplasmina circulante es agotada.

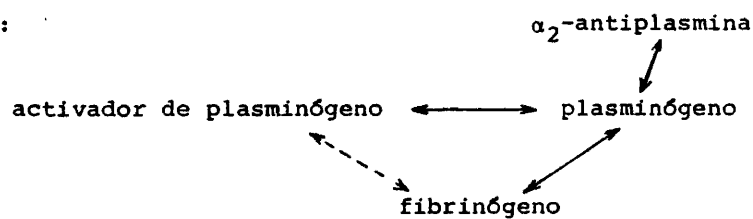
Ambos supuestos se han aplicado con fines terapéuticos. En terapia con uroquinasa, la activación fibrinolítica es moderada y el plasminógeno no es activado totalmente (107). Con estreptoquinasa, la activación fibrinolítica es más extensa con producción de fibrinogenólisis (108).

La observación de que la trombosis venosa está asociada con un descenso en la actividad fibrinolítica, ha estimulado el interés en drogas que incrementan la síntesis y liberación del activador del plasminógeno de la pared vascular. Ej: adrenalina, ácido nicotínico, histamina, vasopresina (todas

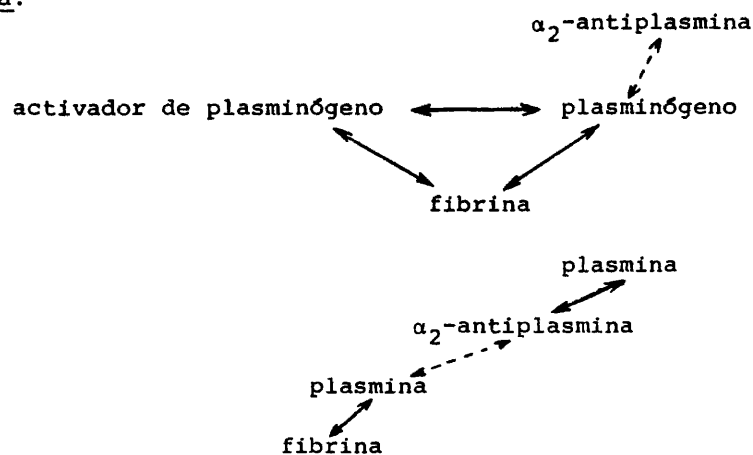
ESQUEMA 8

Fibrinolisis fisiológica

A: en plasma:



B: en fibrina:



Representación esquemática de las interacciones entre fibrinógeno, plasmina (plasminógeno), α_2 -antiplasmina y activador del plasminógeno. El grado de afinidad viene indicado por: --- (menor afinidad) y — (mayor afinidad).

con efecto de corta duración), biguanidinas, esteroides anabólicos, etc. Se espera una mejora en la trombolisis con activadores que tienen una mayor afinidad por la fibrina y que aseguren una activación más selectiva del plasminógeno en la superficie de la fibrina. Estos activadores aún no se conocen.

Alternativamente, puede ser ventajoso aumentar la adsorción de plasminógeno, equivalente a aumentar la cantidad potencial de plasmina formada in vivo. Kakkar (109) ha obtenido un incremento en el efecto trombolítico con tal terapia en trombosis venosa; y Brochier (110) en embolismo pulmonar. La administración de dosis de plasminógeno (plasmina), que no exceden la capacidad inhibitoria de la α -antiplasmina, no tiene efecto. Sin embargo, la administración de plasminógeno o plasmina (antes de estreptoquinasa o uroquinasa) puede mejorar el efecto trombolítico (111).

Cuestiones sin resolver. Son muchos los puntos que aún permanecen sin resolver sobre el sistema fibrinolítico, y teniendo presente que una fibrinólisis deficiente contribuye al desarrollo de enfermedades trombóticas y posiblemente ateroscleróticas, la necesidad y la urgencia de esclarecerlas es obvia.

Entre las cuestiones aún desconocidas podríamos mencionar:

- Los mecanismos responsables del control de la síntesis del activador del plasminógeno, y de los mecanismos para su liberación en estados trombóticos.
- La sensibilidad del plasminógeno adsorbido por los activado-

res del plasminógeno.

- La renovación del plasminógeno y activadores en la superficie del trombo.
- Las diferencias cuantitativas en la interacción de plasminógeno con fibrina y fibrinógeno.
- La resistencia a la lisis de trombos envejecidos.

I.3.- OBJETIVOS

Al abordar el tema de la fibrinólisis existe una doble vertiente, por un lado los aspectos estructurales y químico-físicos de sus componentes, así como la interacción entre ellos, y por otro lado los aspectos terapéuticos o profilácticos con proyección en el campo de la Medicina.

En el presente trabajo se ha pretendido abarcar estas dos facetas de un sistema tan complejo, con el fin de aportar algo nuevo tanto en el campo de los conocimientos básicos como en el de las aplicaciones en Medicina.

De las cuestiones que aún permanecen sin resolver expuestas anteriormente, se han seleccionado para su estudio, por un lado las más críticas para poder entender el mecanismo de acción del sistema fibrinolítico, y por otro lado las que requieren más urgencia en el campo de la clínica.

Con estos criterios, los trabajos realizados han tenido como objetivos:

- Estudiar la interacción entre la fibrina (fibrinógeno) y el plasminógeno.

- 42 -

- Estudiar la eficacia del sistema plasminógeno-plasmina en la lisis de la fibrina.
- Estudiar la susceptibilidad a la lisis de coágulos envejecidos.

Capítulo II.- MATERIALES Y METODOS

II.1.- PREPARACION DE FIBRINOGENO

II.1.1.- Purificación de fibrinógeno

Fibrinógeno humano (Fg) (Kabi, grado L, Estocolmo, Suecia), ha sido purificado según el método de Brown y Rothstein (112) con algunas modificaciones.

0,1 g de fibrinógeno se disolvieron en 7,5 ml de una solución 0,1M de ácido ϵ -amino caproico. A esta solución se le añadieron 0,4 g de sulfato bórico, previamente tratado por ebullición durante una hora con 100 ml de citrato sódico 1 mM, con el fin de eliminar el plasminógeno.

La mezcla se agitó lentamente durante una hora a temperatura ambiente, se centrifugó a 6.000 rpm durante 10 min recogiendo el fibrinógeno en el sobrenadante. Este se precipitó mediante la adición de 1/3 del volumen total de una solución 4M de sulfato amónico. La precipitación se llevó a cabo a 4°C, lentamente y con agitación. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 min y el fibrinógeno así purificado y exento de plasminógeno se disolvió en tampón fosfato sódico potásico 0,018M, ClNa 0,05M, pH 7,8, $\mu=0,15$, y se dializó frente al mismo o frente a ClNa 0,15M, Tris-ClH 0,01M, pH 7,8, cambiando de tampón de diálisis repetidas veces hasta que la reacción con el reactivo

Nessler fuera negativa, indicando que la disolución está libre de iones amonio.

El rendimiento aproximado del proceso es de un 80% y el grado de pureza, determinado por la cantidad de proteína coagulable es superior al 95% oscilando entre 97 y 98%.

El fibrinógeno así preparado se almacenó en volúmenes de 10 a 20 ml a -17°C .

II.1.2.- Determinación de la concentración de fibrinógeno

La concentración de fibrinógeno se ha determinado espectroscópicamente por medidas de absorbancia a 280 nm y 320 nm usando el coeficiente de extinción obtenido por Mihalyi (113):

$$E_{280}^{0,1\%} - E_{320}^{0,1\%} = 1,506$$

para células de 1 cm de paso de luz.

II.1.3.- Determinación del % de proteína coagulable

El grado de pureza de la solución de fibrinógeno se ha determinado midiendo la coagulabilidad con trombina según el método de Laki (114). Para ello se ha utilizado trombina bovina de la casa Sigma y se han tenido en cuenta las condiciones óptimas de concentración y pH descritas por Ferry y Morrison (115).

A 1 ml de una solución de fibrinógeno purificado de concentración exactamente conocida (aproximadamente 1 mg/ml), se le añadieron 15 μl de una solución de trombina (150 unida-

des/ml) en ClNa 0,15M, agitándose rápidamente.

La mezcla se dejó durante dos horas en reposo a temperatura ambiente, tiempo suficiente para obtener un coágulo consistente, perfectamente formado. Pasado este tiempo se retiró el coágulo eliminando la mayor cantidad posible de líquido de su interior y se determinó la concentración de proteína que quedó sin coagular en el sobrenadante.

Con este valor y el de la concentración de fibrinógeno inicial se calculó el tanto por ciento de proteína coagulable.

II.2.- PREPARACION DE FIBRINA

El fibrinógeno se convierte en fibrina mediante la acción de la trombina que separa los fibrinopéptidos A y B de los extremos N-terminales de las cadenas A(α) y B(β) respectivamente, como describe Blombäck (116).

La agregación de varias moléculas de fibrina origina el polímero intermedio (117) que es una cadena lineal todavía soluble. Por último tiene lugar la agregación lateral de estos polímeros intermedios dando lugar al coágulo de fibrina.

Atendiendo a la solubilidad en agentes disociantes es posible distinguir dos tipos de fibrinas, una soluble en urea 6M o guanidina concentrada y otra que es insoluble en urea o guanidina 6M.

Si la reacción de polimerización de fibrina se lleva a cabo en presencia de iones calcio y de factor XIII (factor estabilizador de fibrina), se producen uniones covalentes entre

restos laterales de cadenas peptídicas originándose esta fibrina insoluble.

II.2.1.- Obtención de coágulos de fibrina

Para estabilizar el coágulo de fibrina, se añadió al fibrinógeno antes de la coagulación cisteína y cloruro cálcico hasta una concentración final de 0,0125 y 0,025M, respectivamente. El factor XIII se halla en muy baja proporción junto con el fibrinógeno pero en suficiente concentración para actuar como catalizador de la reacción.

A la disolución se le añadió trombina en la proporción de 2 unidades por mg de proteína y se dejó coagular durante dos horas a 25°C. Pasado este tiempo los coágulos, perfectamente formados, se despegaron de las paredes del tubo y se sometieron a la acción de un campo centrífugo de 1.500 xg durante 30 min.

Los coágulos así retraídos se comprimieron con una varilla de cristal contra las paredes del tubo con el fin de eliminar la máxima cantidad de líquido englobada por los mismos.

El grado de estabilización de coágulos así preparados se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida, previa reducción de las muestras.

II.3.- PREPARACION DE PLASMA

Se ha utilizado plasma procedente de donantes normales, obtenido en presencia de citrato sódico, suministrado por el Servicio de Hematología-Hemoterapia del Centro Especial Ra-

món y Cajal de la Seguridad Social.

El plasma, en unidades de aproximadamente 450 ml, fué centrifugado a 1.500xg durante 1 mín para eliminar restos de eritrocitos y a 4.300xg durante 10 mín para eliminar las plaquetas que pudieran acompañarle.

El plasma una vez exento de restos celulares, con un aspecto transparente y homogéneo, fué almacenado en volúmenes de 10 ml y conservado a -17°C hasta su utilización.

II.3.1.- Obtención de coágulos de fibrina

A volúmenes de 0,25 ml, 0,50 ml, 1 ml y 2 ml de plasma se les ha añadido cloruro cálcico a concentración final de 0,025M y 10, 20, 40 y 80 μ l respectivamente de trombina bovina (150 unidades/ml). En el plasma se encuentra presente el factor XIII requerido para originar fibrina estabilizada.

La mezcla se dejó en incubación dos horas a 25°C. Pasado este tiempo los coágulos se despegaron de las paredes del tubo y se sometieron a la acción de un campo centrífugo de 1.500xg durante 30 mín.

Los coágulos así retraídos se comprimieron contra las paredes del tubo con una varilla de cristal. El grado de estabilización de los mismos se realizó por electroforesis en gel de poliacrilamida previa reducción total, como se describe más adelante.

II.4.- ESTABILIDAD DE LA FIBRINA

Con el fin de comprobar el grado de estabilización de coágulos de fibrina, procedentes de fibrinógeno purificado y de plasma, se ha realizado un estudio comparativo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) de las muestras reducidas.

El estudio de las bandas electroforéticas permite conocer el grado de estabilización de la fibrina. La reducción de fibrina soluble da lugar a tres bandas electroforéticas que corresponden a las cadenas α , β y γ de la molécula de fibrinógeno, mientras que la reducción de fibrina tramada origina además de las bandas correspondientes a las cadenas sencillas, dos nuevas bandas, una que corresponde a dímeros γ - γ y otra a polímeros ap.

II.4.1.- Reducción de enlaces disulfuro

La reducción de las muestras se ha realizado según el método de M.L. Schwartz (118) utilizando 2-mercaptoetanol procedente de los laboratorios Sigma. La mercaptolisis es un método más rápido y de mayor rendimiento que la sulfitolisis (119).

La reducción se ha llevado a cabo en tampón fosfatos 40 mM, pH 7,1, conteniendo urea 9M y SDS al 3%, empleándose 50 μ l de mercaptoetanol por mg de proteína, lo que equivale a un 3%.

La reducción se realiza a 37°C durante toda la noche,

lo que garantiza la ruptura de todos los puentes disulfuro.

II.4.2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE).

Se ha realizado en geles al 5% siguiendo el método de Weber y Osborn (120) con algunas modificaciones.

Se prepararon geles al 5% en acrilamida realizando la polimerización con una relación de acrilamida a bisacrilamida (N-N'-metilenbisacrilamida) de 37:1. Como agentes catalizadores de la reacción se emplearon N-N-N-N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y persulfato amónico. Se utilizaron 25 μ l de TEMED y 1 ml de una solución de persulfato amónico de 15 mg/ml por cada 30 ml de la mezcla a polimerizar. De esta forma se consigue una polimerización lenta y perfecta sin que el TEMED afecte a la migración de las proteínas en geles que contienen SDS (121, 122).

La polimerización se realizó en presencia de sulfato sódico de dodecilo al 0,1% en tampón fosfato pH 7,1, conteniendo urea 5M y EDTA 2 mM, en caso de condiciones reductoras. La dimensión de los geles fue de 8 cm de largo y 6 mm de diámetro.

Las muestras (alrededor de 100 μ g de proteína) se aplicaron bien directamente (caso de muestras reducidas) o previa incubación en 2% de SDS (muestras no reducidas). La intensidad de corriente fue de 8 mA por gel durante 5 horas.

La tinción de los geles se realizó durante una hora con una solución de azul de Coomassie al 0,15% en metanol al 45% y ácido acético al 5%.

Los geles se destiñeron por difusión en una mezcla metanol-acético-agua en proporción 20:7:73 (123), y se conservaron en acético al 7%.

Las proporciones de cada una de las bandas de proteína en el gel se determinaron en un microdensitómetro Joyce Loebel modelo MK IIIC de doble haz. Se obtuvieron densitogramas en los que cada banda electroforética está representada por un pico cuya área es prácticamente proporcional a la cantidad de proteína que contiene.

Cuando las proteínas son tratadas con un detergente tal como sulfato sódico de dodecilo, se forman unos complejos proteína-SDS cuya carga superficial es casi enteramente debida a la de los iones sulfato expuestos, existiendo una relación casi lineal entre la movilidad electroforética de estos complejos y el logaritmo de la masa molecular de la proteína (124).

Conociendo la movilidad electroforética de una proteína se puede calcular su masa molecular mediante un patrón hecho con proteínas estandar. En este estudio, se han utilizado como proteínas estandar: seroalbúmina bovina (Sigma), monómero (68.000), dímero (136.000), trímero (204.000) y las cadenas A α (68.000), B β (57.000) y γ (48.000) procedentes de la reducción de fibrinógeno humano.

II.5.- PREPARACION DE PLASMINOGENO

II.5.1.- Caracterización del plasminógeno

Se ha utilizado plasminógeno humano (Pg) (Kabi, Esto-

colmo, Suecia), de un elevado grado de pureza y con una actividad de 15-20 unidades caseinolíticas por mg de proteína.

El plasminógeno, preparado a partir del sobrenadante I de Cohn por cromatografía de afinidad en Lys-sefarosa según el método de Deutsch y Mertz (73), ha sido disuelto en 2 ml de agua destilada, centrifugado y dializado a 4°C toda la noche frente al tampón conveniente, tamón NaCl 0,05M, fosfato sódico potásico 0,018M pH 7,8 o tampón NaCl 0,15M, Tris 0,01M, pH 7,8.

El grado de pureza y la caracterización de la proteína se ha realizado por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico, en geles al 5%.

La homogeneidad de la proteína se ha determinado también por ultracentrifugación analítica.

II.5.2.- Determinación de la concentración de plasminógeno

La concentración de plasminógeno se ha determinado espectroscópicamente por medidas de absorbancia a 280 nm y 320 nm usando el coeficiente de extinción obtenido por Robbins (125):

$$E_{280}^{0,1\%} - E_{320}^{0,1\%} = 1,7$$

para células de 1 cm de paso de luz.

II.6.- PREPARACION DE ^{125}I -PLASMINOGENO

II.6.1.- Obtención y purificación de ^{125}I -plasminógeno

La iodación del plasminógeno se ha realizado según el

método de Greenwood y Hunter (126) con algunas modificaciones.

Los pasos seguidos, operando con las debidas precauciones y bajo vitrina, han sido los siguientes: se mezclaron 20 μ l de tampón Tris 0,1M, NaCl 2,5M, EDTA 0,01M pH 7,2 (10 veces concentrado); 10 μ l de ^{125}NaI (1 mCi) de la solución estandar (iodo en NaOH de 5 mCi por vial); 200 μ l de la solución de proteína conteniendo alrededor de 10 μ g, y 20 μ l de una solución recién preparada de cloramina T (1 mg/ml).

La mezcla se dejó reaccionar durante 1 min a temperatura ambiente. La reacción se paró con 20 μ l de metabisulfito sódico (3 mg/ml). Se añadieron 20 μ l de yoduro potásico 5M para diluir el ^{125}I y 100 μ l de solución de seroalbúmina bovina (1 mg/ml).

La mezcla se pasó por una columna G-50 de 10 ml equilibrada con tampón Tris, NaCl, EDTA y 0,01% Tritón o con tampón fosfatos 0,01M, NaCl 0,01M, pH 7,2, recogiénose en el primer tubo 2 ml y en las posteriores fracciones de 10 gotas.

II.6.2.- Medida de radioactividad

La radioactividad de las fracciones recogidas se midió en un Espectrógrafo Gamma de la casa Packard.

La proteína marcada y purificada apareció en las fracciones 8-11. Estas se mezclaron y se dializaron toda la noche a 4°C frente a tampón fosfatos 0,01M, NaCl 0,01M, pH 7,2.

La radioactividad de la solución se midió de nuevo , siendo esta de 8×10^4 cpm/ μ l. La proteína marcada se conservó a

-17°C hasta su utilización.

II.7.- ACTIVADORES: DETERMINACION DE ACTIVIDAD PLASMINA

En el presente trabajo se han utilizado los activadores exógenos estreptoquinasa (SK) y uroquinasa (UK), ambos empleados en el tratamiento de enfermedades trombo-embólicas, tanto con fines profilácticos como terapéuticos (127).

La estreptoquinasa (Behringwerke) altamente purificada, obtenida del filtrado del cultivo de estreptococos beta-hemolíticos del grupo C con una actividad de 4,160 IU, ha sido disuelta en agua destilada hasta una concentración de 125 IU/mg.

La uroquinasa (Roger) obtenida a partir de orina humana con una actividad de 400 unidades CTA (unidad adoptada en 1964 por el Comité de Agentes Trombolíticos) equivale a 1 IU (unidad internacional) (128).

Para la activación, la relación de activador empleada ha sido de 4 unidades del mismo por unidad caseinolítica de plasminógeno, esto equivale a una relación SK:Pg de 1:2 (p/p) y UK:Pg de 1:6,5 (p/p). Siendo el tiempo de incubación de 30 min a temperatura ambiente.

El mecanismo de activación de plasminógeno a plasmina se realiza mediante la ruptura de la unión Arg 560 - Val 561 del plasminógeno dando lugar a dos cadenas unidas entre sí por un enlace disulfuro. La uroquinasa es una proteína del tipo tripsina que actúa directamente sobre la molécula de plasminógeno, mientras que la estreptoquinasa no posee actividad protea-

sa o esterasa y la activación se realiza de manera indirecta tras la formación de un complejo SK-Pg o SK-Pm con un centro activo capaz de actuar como activador (129, 130). Tanto en un caso como en otro, el resultado es la formación de plasmina.

La determinación de la actividad plasmina se ha realizado por su actividad proteolítica usando como sustrato fibrina (método fibrinolítico), su actividad estereolítica usando como sustrato TAME (p-toluen sulfonil-L-arginina-metil ester) y su actividad amidolítica usando el sustrato cromogénico S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-p-nitro anilida).

II.7.1.- Método fibrinolítico

La plasmina es una serina-proteasa de especificidad semejante a la tripsina que hidroliza uniones arginina y lisina en proteínas y péptidos (131).

Uno de los métodos para la detección de plasmina se basa en esta actividad proteolítica y utiliza como sustrato fibrina.

Para dicha determinación se ha utilizado 1 ml de una disolución de fibrinógeno (2 mg/ml) en tampón fosfatos 0,018M, pH 7,8, a la cual se ha añadido trombina en una relación de 2 unidades por mg de proteína. Después de dos horas de incubación a temperatura ambiente, el coágulo formado se ha lisado incorporando la mezcla plasminógeno-activador.

La cinética de lisis se ha seguido espectroscópicamente a 280 nm y 320 nm a través de los péptidos liberados al me-

dio a distintos intervalos de tiempo.

La determinación de la actividad plasmina se realiza por el tiempo de lisis de coágulos de fibrina (132).

II.7.2.- Método estereolítico

La plasmina posee actividad esterasa lo cual hace posible su detección mediante el empleo de sustratos específicos destinados a tales fines (133).

En el presente trabajo se ha utilizado el sustrato p-toluen sulfonil-L-arginina-metil ester (TAME), el cual tiene la ventaja de poseer una gran sensibilidad y especificidad hacia la plasmina. Se ha seguido el método descrito por K.A. Walsh (134), con algunas modificaciones.

El sustrato TAME de la casa Sigma se ha disuelto en tampón Tris 0,04M, CaCl_2 0,01M, pH 8,1, hasta una concentración de 1 mM. A 3 ml de la disolución del sustrato se le añadieron 0,1 ml de la disolución de enzima a distintas concentraciones.

El cambio de absorbancia que acompaña la hidrólisis de TAME se ha registrado en un espectrofotómetro Beckman D.U. a 247 nm con cubetas de 10 mm de paso de luz.

Teniendo en cuenta que el cambio de absorbancia que acompaña a la hidrólisis de 1 μmol de TAME por mililitro de la disolución es $0,409 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, se puede cuantificar la cantidad de plasmina presente en la disolución.

II.7.3.- Método amidolítico

La plasmina, al igual que otras serino proteasas plasmáticas, posee actividad amidolítica (135).

Esto ha dado lugar a la aparición en el mercado de una gran variedad de sustratos sintéticos muy específicos para poder detectar las distintas enzimas presentes en plasma (136).

El sustrato cromogénico diseñado para la detección de actividad plasmina es el denominado S-2251 de fórmula H-D-Val-Leu-Lys-NH-(\bar{O})-NO₂.2HCl (137, 138).

La plasmina obtenida tras activación del plasminógeno con el activador, cataliza la liberación de p-nitro anilina (pNA), que puede ser detectada fotométricamente a 405 nm, bien por el método de la velocidad inicial o por el método del punto final (parando la reacción con ácido acético), existiendo una correlación lineal entre $\Delta A/\text{min}$ (Absorbancia) y concentración de plasmina.

La concentración de plasmina se calcula usando un patrón con cantidades conocidas de plasmina.

En el presente trabajo se ha utilizado el sustrato S-2251 de la casa Kabi (Estocolmo, Suecia), disuelto en tampón Tris-ClH 0,05M, NaCl 0,012M, pH 7,4. A 300 μl de la mezcla plasminógeno-activador o de plasmina o de plasma a diferentes diluciones se le ha añadido 700 μl de sustrato, de manera que la concentración final fuera de $6 \times 10^{-4} \text{M}$.

Por el método de la velocidad inicial, la liberación de pNA se ha seguido en un espectrofotómetro Perkin Elmer 2000

de doble haz a 405 nm y temperatura ambiente, registrándose el cambio de absorbancia durante los primeros 10 min una vez iniciada la reacción.

Por el método del punto final el cambio de absorbancia se mide al cabo de 180 seg de incubación a temperatura ambiente ($\approx 20^{\circ}\text{C}$), una vez parada la reacción con 100 μl de ácido acético al 50%.

II.8.- TECNICAS EXPERIMENTALES DE ESTUDIOS DE UNION

PLASMINOGENO-FIBRINOGENO (FIBRINA)

Estudios de unión del plasminógeno al fibrinógeno (fibrina) llevados a cabo por diferentes autores utilizando diversas técnicas tales como: medidas en plasma y suero, medidas antes y después de eluir con ácido hexanoico, uso de proteínas marcadas (^{125}I , tecnecio), etc, han dado lugar en la bibliografía a una gran dispersión de datos (139).

En el presente trabajo dicho estudio se ha realizado utilizando distintos métodos y bajo condiciones que permitieran aunar la variedad de información de otros autores y llegar a resultados concluyentes.

Se ha estudiado la unión del plasminógeno al fibrinógeno cuando éste se encuentra en estado de fibrina tras coagulación del mismo en condiciones estabilizadoras, tanto a nivel de sistema purificado (con fibrinógeno) como a nivel plasmático.

En dichos estudios se ha cuantificado el plasminógeno unido a la fibrina por métodos analíticos (sustratos TAME y

S-2251) y radioactivos (^{125}I -Pg), siendo uno de los puntos decisivos en dicha determinación la manipulación de los coágulos (retracción de los mismos y grado de lavado).

Estudios de la unión Pg-Fg en condiciones de disolución se han realizado por ultracentrifugación analítica.

II.8.1.- Métodos analíticos

A nivel de sistema purificado se ha cuantificado el plasminógeno que permanece unido al fibrinógeno tras coagulación del mismo con trombina y determinación de actividad plasmina residual después de retirar el coágulo y activar el líquido resultante con estreptoquinasa.

A fibrinógeno humano Kabi disuelto en tampón fosfatos 0,018M, pH 7,8, se le ha añadido plasminógeno, cloruro cálcico, cisteína y trombina en el orden indicado. Las concentraciones empleadas han sido de 2,9 μM para el fibrinógeno, de 0,55 μM a 2,2 μM para el plasminógeno, de 0,025M para el cloruro cálcico, de 0,0125M para la cisteína y trombina en una relación de 2 unidades por mg de fibrinógeno; todas ellas concentraciones finales en un volumen total de un mililitro.

La mezcla se ha dejado generalmente durante dos horas a temperatura ambiente. Los coágulos así preparados se han retraído por centrifugación a 1,500 xg durante 30 min y extraídos con una varilla de cristal comprimiéndolos contra las paredes del tubo.

Al sobrenadante se le ha añadido el activador estreptoquinasa en una relación SK:Pg (p/p) de 1:2 respecto al plasminógeno

original en la mezcla, lo que equivale a 4 unidades de estreptoquinasa por unidad caseinolítica de plasminógeno.

Después de 30 min de incubación a temperatura ambiente se ha determinado actividad plasmina utilizando como sustratos bien TAME (método estereolítico), S-2251 (método amidolítico) o ambos.

La determinación del plasminógeno unido a la fibrina se ha realizado sustrayendo el plasminógeno remanente en el sobrenadante del plasminógeno inicial añadido a la mezcla.

Con el fin de detectar directamente el plasminógeno unido a los coágulos de fibrina, éstos se han sometido a ultrasonificación durante 5 min en un Ultrasonic Power Unit MSE (20 KHz), operando a la máxima potencia resonante; esta operación se realiza en un baño de hielo.

Los sonicados, en un volumen final de 1 ml de tampón fosfatos 0,018M, pH 7,8, han sido centrifugados a 1.500 xg durante 30 min determinándose actividad plasmina del sobrenadante después de ser activado éste con estreptoquinasa, como se ha indicado anteriormente.

En el caso de plasma humano, el plasminógeno libre se ha determinado midiendo la cantidad de plasminógeno presente en el suero tras coagulación de 1 ml de plasma con cloruro cálcico (concentración final de 0,015M y 40 µl de trombina (150 unidades/ml).

Para la determinación de actividad plasmina tanto en el plasma como en el suero se ha utilizado el sustrato cromogénico S-2251.

II.8.2.- Método radiactivo

La cuantificación del plasminógeno unido al fibrinógeno tanto en un sistema purificado como en plasma se ha determinado por métodos radiactivos mediante el empleo de ^{125}I -plasminógeno.

Con plasma se ha cuantificado el plasminógeno que permanece unido al fibrinógeno por detección directa de radiactividad en el interior del coágulo de fibrina y radiactividad en suero. Volúmenes de 0,25 ml, 0,50 ml y 1 ml de plasma, según los casos, se incubaron con cantidades medidas de ^{125}I -plasminógeno (5, 10 y 20 μl , respectivamente) a 20°C durante distintos tiempos (de 30 min a 4 horas). En todos los casos se tomaron muestras de 20 μl para medir la radiactividad por unidad de volumen, antes de la coagulación. Pasado este tiempo de incubación, las mezclas se coagularon por la adición de cloruro cálcico (concentración final 0,025M) y 10, 20 y 40 μl de trombina (150 unidades/ml) respectivamente, dejándolas dos horas de incubación a temperatura ambiente.

Una vez formado el coágulo de fibrina, éste se retiró por centrifugación a 1.500 xg durante 30 min y se tomaron de nuevo muestras de 200 μl de sobrenadante para medir radiactividad.

La cantidad de plasminógeno unida a la proteína coagulada se calculó bien por diferencia entre la radiactividad de la mezcla inicial y radiactividad del sobrenadante o midiendo directamente la radiactividad presente en el coágulo. »

La retención del plasminógeno por la fibrina en función del lavado del coágulo se determinó midiendo la radioactividad del mismo: 1) sin lavado previo, 2) tras lavado con un volumen de 5 ml de NaCl 0,15M (lavado intermedio), 3) después de lavado con un volumen de 25 ml de NaCl 0,15M (5 lavados de 5 ml cada uno), lavado exhaustivo.

Con fibrinógeno purificado se ha determinado el plasminógeno unido al fibrinógeno, tras coagulación de la mezcla Pg-Fg con cloruro cálcico y trombina, determinándose radioactividad tanto del coágulo (con y sin lavado) como del sobrenadante.

Se incubaron volúmenes de 1 ml de fibrinógeno de concentración final 1,4 μ M en tampón fosfatos con distintas cantidades de 125 I-Pg (de 1,5 μ M a 11,4 μ M) a 20°C durante 30 min. Las soluciones de plasminógeno se obtuvieron añadiendo Pg frío a la solución de 125 I-Pg hasta la concentración deseada.

Se operó como se indicó anteriormente y con los datos obtenidos se calcularon las constantes de disociación y el número de sitios de unión en fibrinógeno, mediante la representación de Scatchard (140).

En estos experimentos debido a la alta concentración de plasminógeno utilizada, y ante la posible presencia de trazas de plasmina, el plasminógeno se incubó previamente durante 30 min con el inhibidor pancreático-aprotinina (Trasylol) de la casa Bayer con una actividad de 100.000 unidades/5 ml; en una relación de 1.000 unidades por mg de proteína, lo que equivale a una relación molar Trasylol:Pg de 2:1.

Con este exceso de inhibidor, la plasmina presente es

inhibida inmediatamente por la formación del complejo plasmina-inhibidor, sin ser afectado el plasminógeno (141).

II.8.3.- Ultracentrifugación analítica

La unión de plasminógeno a fibrinógeno en condiciones de disolución se ha realizado por ultracentrifugación analítica.

Los experimentos de ultracentrifugación se han realizado en una ultracentrífuga analítica Spinco/Beckman modelo E con rotor de titanio, en células estandar de aluminio de 12 mm a 60.000 rpm a la temperatura de 20°C.

Se ha empleado el sistema óptico de absorción en el ultravioleta y el sistema óptico "schlieren" que mide el gradiente de índice de refracción en cada punto de la célula. Las placas Schlieren se han medido con un microcomparador Nikon modelo 6C (ampliación x10 ó x20).

El sistema óptico así dispuesto permite que los frentes de cambio de concentración se fotografíen en forma de picos (142). A partir de estas placas fotográficas se puede conocer la velocidad con que una partícula sedimenta en un campo centrífugo dado observando la posición de los máximos de los picos con el tiempo.

El valor del coeficiente de sedimentación se obtiene mediante la expresión

$$s_c = \frac{2,303}{\omega^2} \cdot d \frac{\log r}{dt}$$

donde ω es la velocidad angular, t el tiempo de cada una de las

fotografías y r la distancia del máximo del pico al eje de giro.

Si se representan los valores del $\log r$ frente al tiempo de sedimentación en minutos, la pendiente de la línea recta resultante representa el valor medio del coeficiente de sedimentación en las distintas posiciones.

En el presente trabajo se ha hecho un estudio tanto por densidad óptica como por óptica Schlieren del plasminógeno sólo y de la interacción plasminógeno-fibrinógeno, en presencia del inhibidor Trasylol.

El plasminógeno a distintas concentraciones (de 2 μM a 10 μM) se ha estudiado solo y en presencia del inhibidor Trasylol (1.000 unidades por mg de proteína), en tampón fosfatos 0,018M, ClNa 0,15M, pH 7,8, y en tampón Tris 0,01M, ClNa 0,15M, pH 7,8. Los valores obtenidos se corrigieron a las condiciones de agua y 20°C.

La mezcla plasminógeno-fibrinógeno en presencia del inhibidor se ha estudiado para concentraciones de fibrinógeno de 0,6 μM a 3 μM y concentraciones de plasminógeno de 1,3 μM a 10 μM .

II.9.- TECNICAS EXPERIMENTALES DE ESTUDIOS CINETICOS DE FIBRINOLISIS

Los estudios cinéticos de fibrinólisis con fibrinógeno-fibrina purificado, y con plasma, se han realizado bajo distintas condiciones, con el fin de determinar la eficacia de distintos modelos del sistema fibrinolítico.

Las cinéticas de lisis se han seguido espectroscópicamente en el caso del sistema purificado y por digestión enzimática con tripsina, de los coágulos obtenidos de plasma.

II.9.1.- Métodos espectroscópicos

Con sistema purificado, la variación de la lisis de coágulos de fibrina con el tiempo de incubación una vez añadido el activador se ha obtenido mediante lecturas a distintos tiempos de la absorbancia del sobrenadante a 280 nm y 320 nm en un espectrofotómetro Gilford.

El estudio se ha realizado en presencia y ausencia de inhibidores y por activación externa de los coágulos utilizando los activadores exógenos, estreptoquinasa y uroquinasa.

En ausencia de inhibidores los modelos de sistema fibrinolítico estudiados han sido:

- a) Con plasminógeno dentro del coágulo. A la disolución de fibrinógeno se le añadió Cl_2Ca y cistina hasta concentración final 0,025M y 0,0125M respectivamente, plasminógeno para obtener la relación Pg/Fg (p/p) requerida y trombina en la relación de 2 unidades por mg de proteína.

Esta mezcla se dejó coagular durante dos horas a temperatura ambiente, el coágulo se despegó y se comprimió por centrifugación a 1.500 xg durante 30 min y se separó del sobrenadante. A continuación se lavó con tampón fosfatos 0,018M, pH 7,8, hasta que la absorbancia del líquido de lavado fuera cero (5 lavados de 5 ml cada uno); se sus-

pendió en el mismo tampón y se añadieron 4 unidades de estreptoquinasa o de uroquinasa por unidad caseinolítica de plasminógeno.

- b) Con plasminógeno fuera del coágulo. La disolución de fibrinógeno se coaguló como se ha descrito anteriormente en ausencia de plasminógeno. Al coágulo centrifugado, lavado y suspendido en tampón fosfatos se le añadió plasminógeno en la relación Pg/Fg (p/p) requerida y los activadores en la misma proporción empleada en el caso anterior.
- c) Con plasminógeno dentro y fuera. La disolución de fibrinógeno se coaguló en las mismas condiciones descritas anteriormente pero con la mitad del plasminógeno en la relación Pg/Fg (p/p) requerida. Al coágulo lavado y suspendido en tampón fosfatos se añadió la otra mitad del plasminógeno y los activadores en la proporción ya descrita.

En presencia de los INHIBIDORES naturales del plasma, los casos estudiados han sido:

- a) Inhibidores dentro del coágulo. A 1 ml de una disolución de fibrinógeno de concentración 2 mg/ml se añadió 0,02 mg de plasminógeno y 0,02 ml de suero normal (concentración final 1/50 v/v), la mezcla se coaguló en las condiciones descritas anteriormente. El coágulo lavado se suspendió en tampón fosfatos 0,018M, pH 7,8, se añadieron uno o varios pulsos sucesivos de 4 unidades de activador por unidad caseinolítica de plasminógeno. La lisis del coágulo se siguió como anteriormente se ha descrito.

- b) Inhibidores fuera del coágulo. El coágulo de fibrina se formó en las condiciones descritas en el caso anterior, pero en ausencia de suero, se suspendió en tampón fosfatos en presencia de suero a la concentración final de 1/50 (v/v) y se activó con los activadores en la relación descrita anteriormente.
- c) Inhibición de la lisis por suero deficiente (con el nivel de antiplasminas disminuido). A 2 ml de plasma normal se le añadieron 200 µl de estreptoquinasa (1 mg/ml), la mezcla se dejó dos horas a temperatura ambiente. Se añadieron 0,3 ml de fibrinógeno (concentración 10 mg/ml) y trombina en la relación de 2 unidades por mg de fibrinógeno. Se dejó coagular 2 horas a temperatura ambiente, se centrifugó y el sobrenadante constituye el suero deficiente.

El estudio de la inhibición dentro y fuera del coágulo por este suero se realizó como se ha descrito anteriormente.

II.9.2.- Digestión enzimática

En el caso de coágulos de plasma, la variación de la lisis se ha seguido determinando la cantidad de proteína que contienen los coágulos a distintos intervalos de tiempo, después de la activación con estreptoquinasa o uroquinasa.

Dicha determinación se ha realizado por digestión enzimática de los mismos con tripsina y medidas de la densidad óptica del lisado a 280 nm y a 320 nm frente a un blanco con tripsina. »

Se ha utilizado tripsina (Sigma) disuelta en agua destilada (3 mg/ml) en una relación 1:1 (v:v) respecto al volumen de plasma utilizado para la formación de los coágulos.

Los casos estudiados han sido los siguientes:

- a) En plasma normal. 1 ml de plasma normal se coaguló con 40 μ l de trombina (150 unidades/ml) en presencia de calcio (concentración final 0,025M), se dejó 2 horas de coagulación a temperatura ambiente. El coágulo obtenido se retrajo mediante centrifugación, se lavó exhaustivamente con 25 ml de tampón fosfatos, se suspendió en el mismo tampón y se activó con el activador (SK o UK) en la proporción ya descrita.
- b) En plasma reconstituido. A 0,250 ml de suero normal se añadieron 0,75 mg de fibrinógeno y 0,075 mg de plasminógeno y cloruro cálcico a la concentración final de 0,025M. La mezcla se coaguló con trombina en la proporción de 2 unidades por mg de fibrinógeno. Se dejó 2 horas a temperatura ambiente, se centrifugó, se lavó hasta que la absorbancia del tampón de lavado fuera próxima a cero y se suspendió en el mismo tampón.

La activación se realizó de la manera ya descrita.

- c) En plasma normal añadiendo cantidades crecientes de plasminógeno al medio. A muestras de plasma normal (0,250 ml) se le añadió plasminógeno en la proporción de 10, 25, 50, 66, 100 y 200% respecto al plasminógeno existente (considerando este 60 μ g en los 0,250 ml de plasma). La mezcla así obtenida

nida se coaguló y se activó como anteriormente se ha descrito.

- d) En coágulos de distintas "edades" o grados de envejecimiento. Se prepararon baterías de coágulos (con 0,250 ml de plasma) como anteriormente se ha descrito, dejándolos sumergidos en su propio suero.

Unos coágulos se sacaron en el momento inicial de su formación (coágulos de "edad" 0), otros al cabo de 4 horas (coágulos de "edad" 4), etc. La capacidad de lisis se siguió por digestión enzimática con tripsina como en los casos anteriores.

II.10.- TECNICAS EXPERIMENTALES DE ESTUDIOS DE DIFUSION

Se ha estudiado la permanencia de plasminógeno en el interior de coágulos plasmáticos en función de su "edad" o tiempo transcurrido desde la formación de los mismos. Se ha utilizado plasminógeno marcado ($^{125}\text{I-Pg}$) midiéndose la radioactividad remanente en el coágulo en función del tiempo.

Dichas medidas se han llevado a cabo en unas condiciones que permitieran controlar la posible difusión de plasminógeno desde el interior de los coágulos al medio.

II.10.1.- Difusión en un volumen limitado (concentración exterior variable)

Distintos volúmenes de plasma (0,250 ml, 0,50 ml y

1,0 ml) se incubaron durante 30 min con 10, 20 y 40 μ l de ^{125}I -Pg (8×10^4 cpm/ μ l). Se tomaron muestras de 20 μ l para medir radioactividad. Se añadió cloruro cálcico y trombina dejando la mezcla dos horas a 25°C. Una vez formado el coágulo, éste se despegó de las paredes del tubo y se sometió a la acción de un campo centrífugo de 1.500 xg durante 30 min.

Los coágulos recién formados o bien se dejaron en su propio suero o bien se pusieron en un volumen equivalente de tampón fosfatos 0,018M, pH 7,8.

La radioactividad presente en el coágulo se midió en el momento inicial de su formación, transcurridas 4, 8, 20, 22 y 24 horas.

El porcentaje de material que difunde se calculó por diferencia de radioactividad en la mezcla inicial y radioactividad remanente detectada en el interior del coágulo.

II.10.2.- Difusión en un volumen grande (concentración exterior constante)

Se procedió de la manera descrita anteriormente excepto que los coágulos recién formados en lugar de permanecer o en su propio suero o en un volumen equivalente de tampón, se su mergieron en una cantidad abundante de plasma (100 ml).

II.11.-MICROSCOPIA ELECTRONICA

Coágulos de fibrina procedentes de fibrinógeno puro y de plasma se prepararon según el método de Kay y Cuddigan (143) para ser analizados por microscopía electrónica.

Una gota de una solución de fibrinógeno (6 mg/ml) o de plasma, se aplicó sobre una rejilla cubierta con Formvar y se coaguló con otra gota de trombina (150 unidades/ml). Después de dos minutos a 25°C las rejillas se lavaron con ClNa 0,15M y se tiñeron con acetato de uranilo al 1% durante 5 min.

Las rejillas se lavaron con agua destilada y se secaron al aire durante 24 horas.

Las muestras se analizaron en un microscopio electrónico JEM 100B (Japan Electrical Optical Laboratory Co) a distintos aumentos.

CAPITULO III.- R E S U L T A D O S

III.1.- INTERACCION PLASMINOGENO-FIBRINOGENO-FIBRINA:

ESTUDIOS EN SISTEMA PURIFICADO

III.1.1.- Unión plasminógeno-coágulo de fibrina.

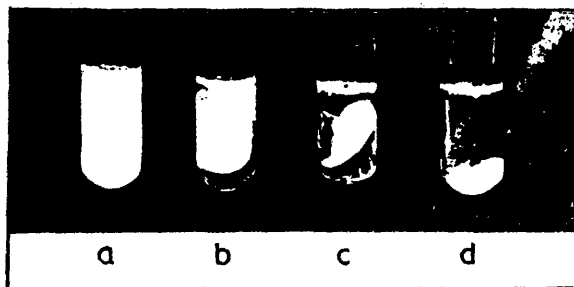
Aspectos macroscópicos

Coágulos preparados a partir de fibrinógeno y plasminógeno puro, utilizando disoluciones de fibrinógeno 1 mg/ml (2,9 μ M) y de plasminógeno 0,1 mg/ml (1,1 μ M) (relación Pg/Fg (p/p de 1/10), presentan después de centrifugados un aspecto blanquecino y compacto, como se puede ver en las fotografías de la Lámina 1A. El volumen de los coágulos representa aproximadamente un 5-6% del volumen inicial de la mezcla. El tamaño de los mismos es de $0,5 \pm 0,08$, $0,8 \pm 0,1$ y $1,4 \pm 0,1$ cm, para 0,5, 1 y 2 mg de Fg respectivamente, como se indica en la Lámina 1B.

El grado de estabilización de los mismos, inducido por el factor XIII, se estudió por electroforesis, después de reducir las muestras con β -mercaptoetanol, en geles de poliacrilamida al 5% en presencia de 0,1% de SDS, utilizando como estándares fibrinógeno y fibrina soluble. En la figura 4 se puede observar la aparición de tres bandas correspondientes a las cadenas polipeptídicas que se identifican como $A\alpha$, $B\beta$ y γ para el fibrinógeno (144) y α , β y γ para la fibrina (145).

LAMINA 1

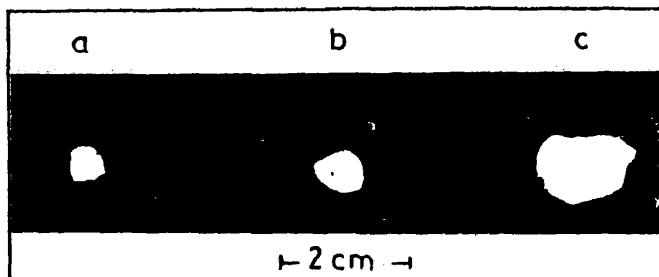
Aspectos macroscópicos de coágulos de fibrina



A

Coágulo de fibrina (1 mg Fg)

- a - Coágulo sin manipular.
- b - Coágulo despegado.
- c - Coágulo retraído.
- d - Coágulo lavado.



B

Coágulo retraído.

- a - 0,5 mg Fg.
- b - 1 mg Fg.
- c - 2 mg Fg.

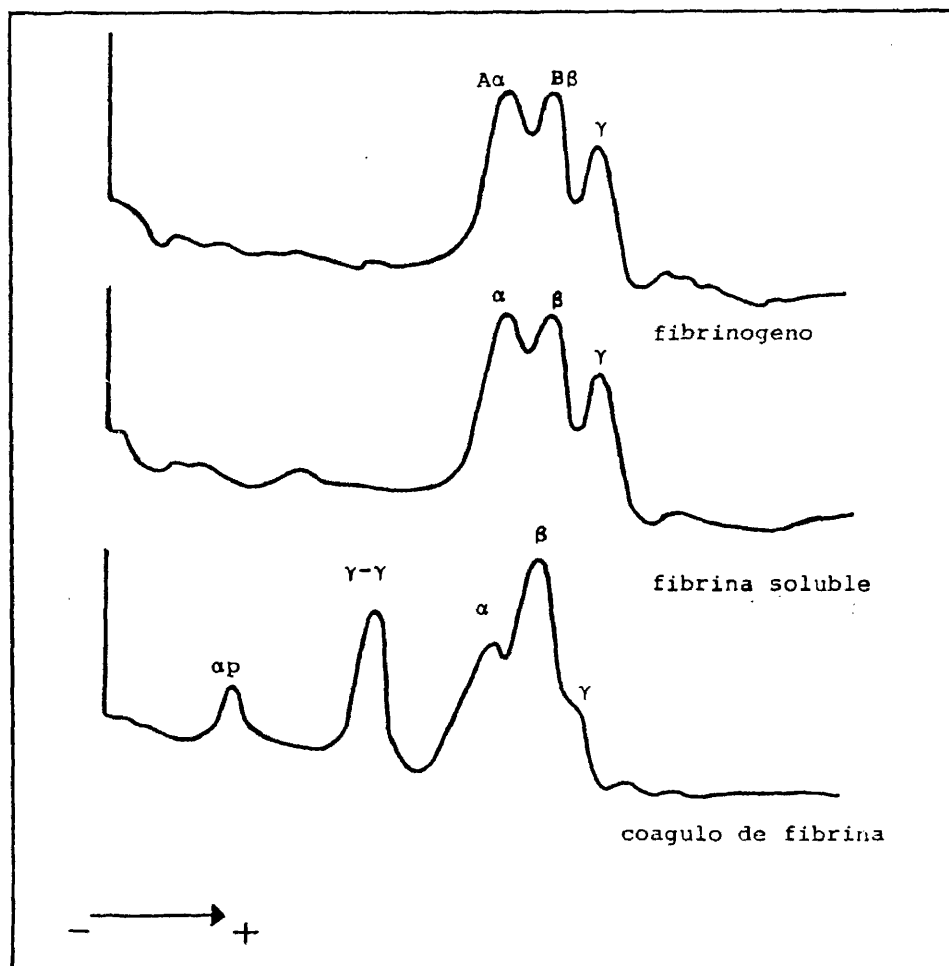


FIGURA 4

Perfiles electroforéticos de muestras reducidas de fibrinógeno, fibrina soluble y coágulo de fibrina.

Electroforesis en geles de poliacrilamida al 5% en presencia de SDS.

En los coágulos de fibrina estabilizada se mantiene el número de cadenas β correspondientes al fibrinógeno original, sin embargo las cadenas γ disminuyen notablemente y desaparecen parcialmente las cadenas α . En estas muestras aparecen dos nuevas bandas electroforéticas de menor movilidad. Estas bandas corresponden a dímeros de cadenas γ y a polímeros de cadenas α , lo cual es indicativo del grado de estabilización de la fibrina (146).

En los coágulos con las características descritas, formados a partir de concentraciones de fibrinógeno de 1,4, 2,9 y 5,8 μM y añadiendo al medio antes de coagular plasminógeno a concentraciones de 0,55, 1,1 y 1,1 μM , de manera que la relación Pg/Fg (p/p) fuera de 1/10, se ha cuantificado por métodos analíticos (utilizando TAME y S-2251) y radiactivos ($^{125}\text{I-Pg}$) la cantidad de Pg unida al coágulo de fibrina.

En la Tabla VIII vienen expresados en tantos por ciento los valores de plasminógeno presentes en el sobrenadante (no unidos) detectados por métodos analíticos y en las condiciones descritas; asumiendo que el resto, equivalente al 60%, permanece unido al coágulo.

La detección del plasminógeno unido al coágulo de modo directo, no ha sido posible tras sonicación del material insoluble; probablemente debido a que la "solubilización" de los coágulos por irradiación con ultrasonidos, o bien rompe o bien inactiva el plasminógeno.

La cuantificación del plasminógeno presente tanto en el sobrenadante como en el interior del coágulo, se realizó

TABLA VIII

Plasminógeno unido y no unido a fibrinógeno
(fibrina)

	A	B	C
Pg	40 (TAME)	-	-
	40 (S-2251)	-	-
	40*		
* Coágulo	60*	50*	24*

* Detectado directamente mediante $^{125}\text{I-Pg}$.

utilizando métodos radiactivos ($^{125}\text{I-Pg}$). Los valores obtenidos se recogen en la Tabla VIII. A representa Pg en el interior de un coágulo sin lavar, B de un coágulo lavado parcialmente y C de un coágulo lavado exhaustivamente como se describe en Métodos.

III.1.2.- Determinación de las constantes aparentes de asociación-disociación de los complejos Pg-Fg-Fn. Métodos analíticos

Para bajas concentraciones de plasminógeno (de 0,05 a 0,200 mg/ml) y una cantidad fija de fibrinógeno (1 mg/ml) se ha determinado la cantidad de plasminógeno que se asocia a la fibrina al coagular los complejos con trombina.

El resultado de tal determinación, usando el sustrato TAME, viene expresado en la Tabla IX.

De los valores de plasminógeno libre se han calculado

TABLA IX

Cantidad de plasminógeno no asociado a la fibrina (al coagular los complejos con trombina) , para bajas concentraciones de plasminógeno y una cantidad fija de fibrinógeno.

Fibrinógeno (moles)	Plasminógeno total (moles)	Plasminógeno libre (moles)
$2,94 \times 10^{-6}$	$5,5 \times 10^{-7}$	$2,2 \times 10^{-7}$
"	$7,7 \times 10^{-7}$	$3,0 \times 10^{-7}$
"	$11,1 \times 10^{-7}$	$4,8 \times 10^{-7}$
"	$11,1 \times 10^{-7}$	$4,3 \times 10^{-7}$
"	$22,2 \times 10^{-7}$	$10,0 \times 10^{-7}$
"	$22,2 \times 10^{-7}$	$9,0 \times 10^{-7}$

los moles de plasminógeno unido, lo cual ha permitido la determinación de v , siendo $v = Pg_{unido}/Pg_{total}$. Mediante la representación doble recíproca, se ha obtenido una recta (Figura 5) que obedece a la ecuación:

$$1/v = 1/n + 1/nK_a \times 1/Pg_{libre}$$

Ajustada por mínimos cuadrados presentaba un coeficiente de correlación de 0,985 con valores de $1/n = 0,50$ y $1/nK_a = 1,79$, con lo que se calculan las constantes aparentes de asociación (K_a) y disociación (K_d), así como una primera estimación del número de sitios de unión (n).

Los valores obtenidos han sido:

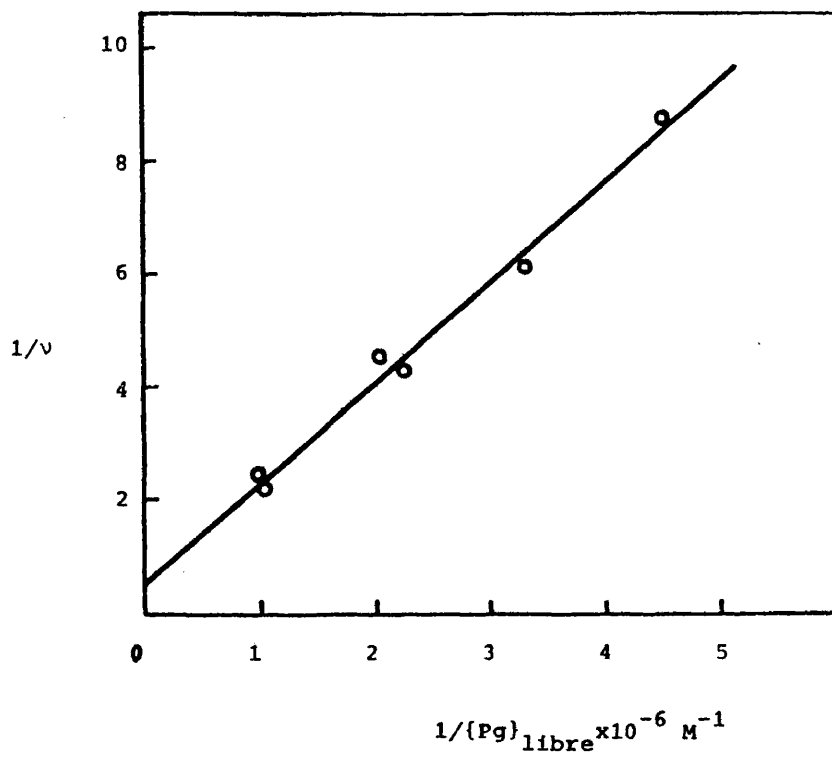


FIGURA 5

Representación doble recíproca de la unión
plasminógeno-fibrina.

$$K_a = 2,75 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$$

$$K_d = 3,58 \times 10^{-6} \text{ M}$$

y número de sitios de unión (n) = 2, lo que sugiere que el fibrinógeno presenta dos sitios de unión para el plasminógeno por molécula.

III.1.3.- Determinación de los sitios de unión.

Estudios de unión ^{125}I -Pg en presencia de inhibidor

Para altas concentraciones de plasminógeno (de 1,5 a 11,4 μM) y una cantidad fija de fibrinógeno (1,4 μM), se ha determinado la cantidad de plasminógeno que se asocia a la fibrina al coagular los complejos con trombina.

El estudio se ha realizado por medidas de radiactividad utilizando ^{125}I -Pg, lo cual ha permitido cuantificar el plasminógeno que permanece unido al coágulo tras lavado exhaustivo del mismo.

Estos experimentos se han llevado a cabo en presencia del inhibidor pancreático aprotinina (Trasylol), pues debido a la alta concentración de Pg utilizado y a la posible presencia de trazas de plasmina, se presentaron problemas de estabilidad de las muestras, lo que se refleja en la aparición de productos de degradación que pueden afectar a la coagulación de las muestras con trombina. Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla X.

Por otra parte, la presencia del inhibidor no afecta

TABLA X

Cantidad de plasminógeno asociada y no asociada a la fibrina, para altas concentraciones de plasminógeno y una cantidad fija de fibrinógeno.

Plasminógeno total (Moles)	Plasminógeno unido tras lavado exhaustivo (Moles)	Plasminógeno libre (Moles)	% unido (Peso)	Relación Pg:Pg (M:M)
$1,5 \times 10^{-6}$	$0,31 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-6}$	20	1:1
$2,1 \times 10^{-6}$	$0,40 \times 10^{-6}$	$1,7 \times 10^{-6}$	19	1:1,5
$3,8 \times 10^{-6}$	$0,70 \times 10^{-6}$	$3,1 \times 10^{-6}$	18,5	1:2,7
$6,0 \times 10^{-6}$	$1,00 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-6}$	16,5	1:4,2
$11,4 \times 10^{-6}$	$1,6 \times 10^{-6}$	$9,7 \times 10^{-6}$	14,5	1:8

a las propiedades de coagulación del Fg. Se comprobó que la cantidad total de fibrina obtenida no disminuía por la presencia de plasminógeno y Trasylol, obteniéndose coagulabilidades de 95-97% del fibrinógeno inicial. Por otro lado, un estudio cinético de la agregación de fibrina realizado por espectrografía, a 350 nm, indica que la velocidad de coagulación no cambia con la presencia de dicho inhibidor.

De los valores experimentales, se ha calculado v ($v = Pg_{unido}/Fg_{total}$) y mediante representación doble recíproca (Figura 6) y de Scatchard (Figura 7) se han obtenido unas rectas que ajustadas por mínimos cuadrados presentaban coeficientes de correlación de 0,99 y 0,97 respectivamente, siendo:

$$K_a = 0,83 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$$

$$K_d = 1,2 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$y \quad n = 2,4$$

III.1.4.- Estudios por ultracentrifugación analítica de los complejos Pg-Fg: aspectos dinámicos de la interacción

La interacción entre Fg y Pg en disolución se ha realizado por ultracentrifugación analítica.

Dicho estudio se ha llevado a cabo a altas concentraciones de plasminógeno (de 1,3 a 10 μM) y en condiciones semejantes a las empleadas en los experimentos de coagulación en presencia del inhibidor Trasylol, en una proporción Pg/Trasylol (en moles) de 1/2.

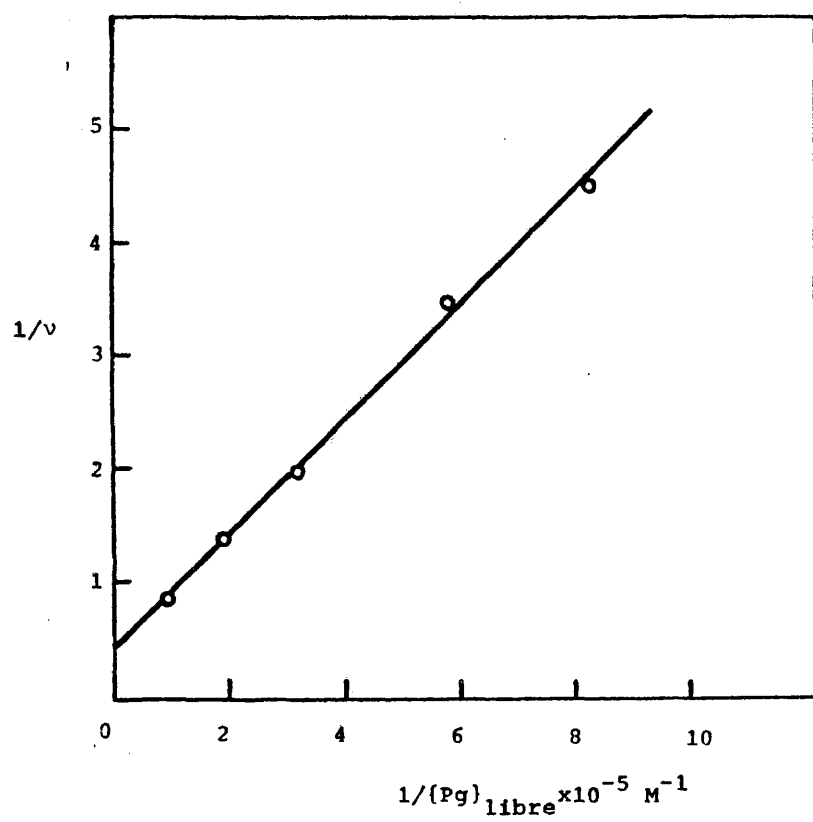


FIGURA 6

Representación doble recíproca de la unión
 ^{125}I -plasminógeno a fibrina.

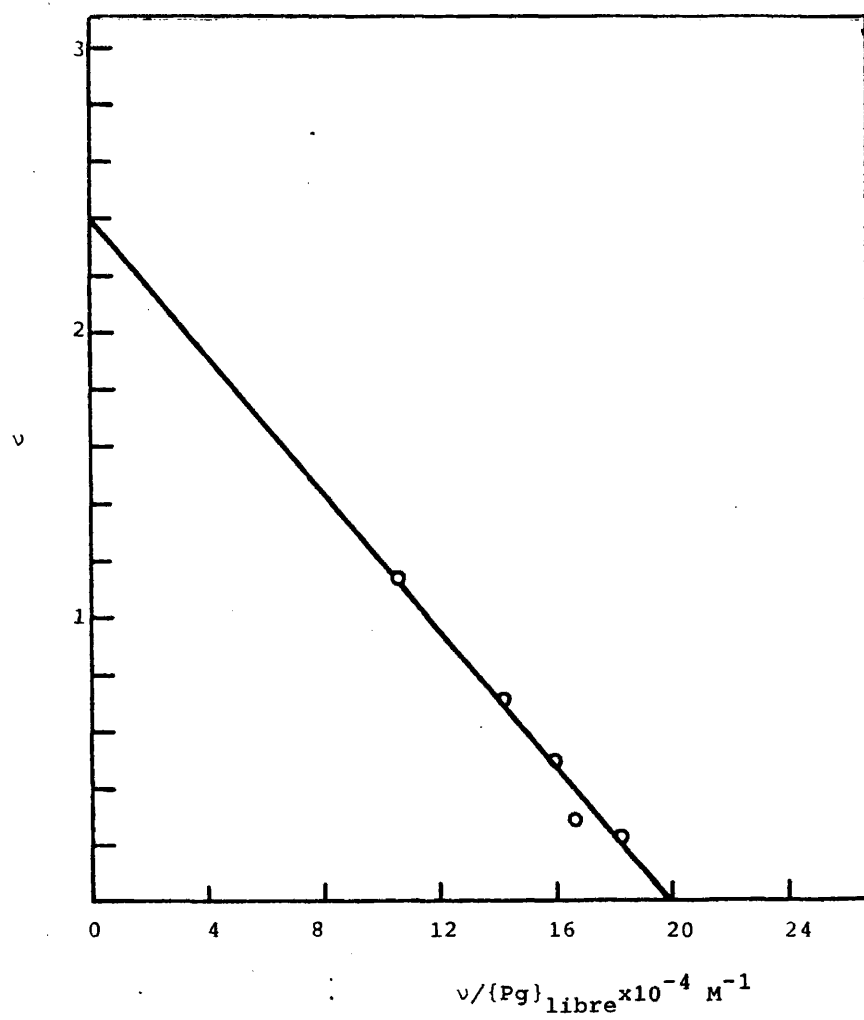


FIGURA 7

Representación de Scatchard de la unión ^{125}I -
plasminógeno a fibrina.

Previo al estudio de la interacción entre dichos componentes, se ha realizado una caracterización tanto del fibrinógeno como del plasminógeno en presencia y ausencia del inhibidor.

Los valores del coeficiente de sedimentación, en condiciones equivalentes a agua a 20°C, obtenidos para concentraciones de Fg de 0,6 a 3 μM oscilan entre 7,2 y 7,79; valores iguales a los encontrados en la bibliografía (147). En presencia de Trasylol los valores obtenidos no varían (Figura 8).

Los valores de coeficiente de sedimentación obtenidos para concentraciones de plasminógeno de 1,3 a 10 μM , oscilan entre 4,5 y 5,5, idénticos a los descritos previamente (64, 76).

En presencia de Trasylol dichos valores no presentan variación (Figura 9).

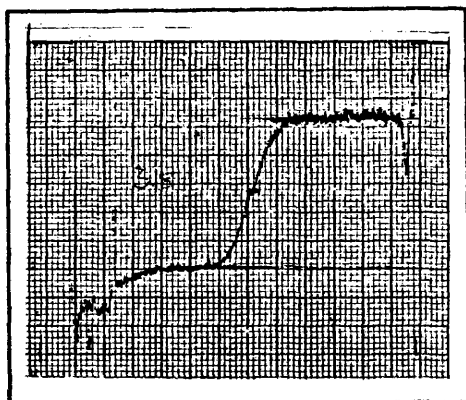
Los valores de coeficientes obtenidos como resultado de la mezcla de dichos componentes vienen expresados en la Tabla XI, donde se observa que no existe variación en los coeficientes de sedimentación de los componentes ni en las concentraciones relativas de los mismos, en el intervalo estudiado.

Los perfiles de ambos componentes, tras haber sido sometidos a un campo centrífugo de 60.000 rpm durante 30 min, se puede observar en la Figura 10.

FIGURA 8

Perfiles de sedimentación a los 60 min.

Plasminógeno
0,3 mg/ml
 $S^{\circ} = 5,04 S$



Plasminógeno
(0,3 mg/ml)
+ inhibidor
(0,04 mg/ml)
 $S^{\circ} = 5,1 S$

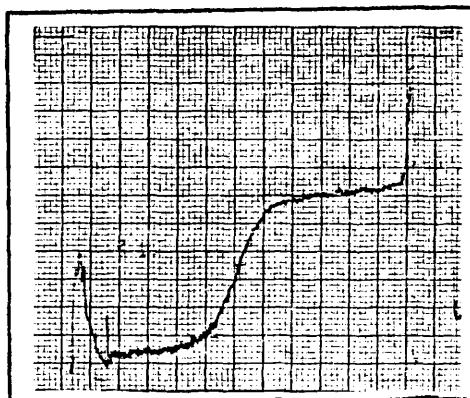


FIGURA 9

Perfil de sedimentación a los 60 min.

Fibrinógeno
(0,5 mg/ml)
+ inhibidor
 $S^{\circ} = 7,5 \text{ S}$

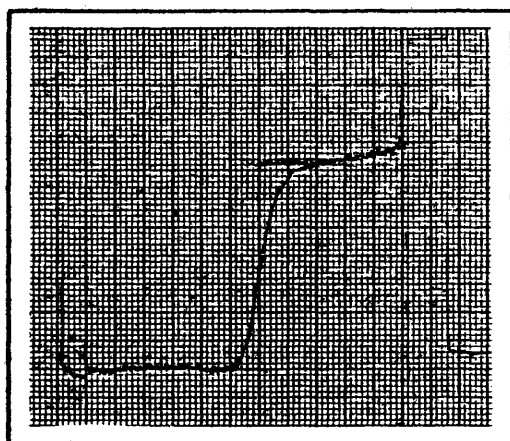


FIGURA 10

Perfil de sedimentación a los 30 min.

Mezcla Fg-Pg .
+ inhibidor
Pg:Fg = 2:1
(mol:mol)
 $S^{\circ}_{Fg} = 7,2 \text{ S}$
 $S^{\circ}_{Pg} = 4,5 \text{ S}$

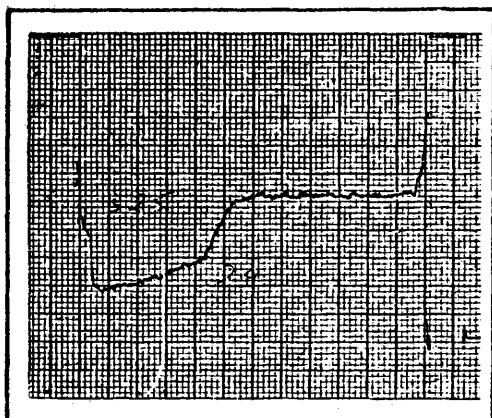


TABLA XI

Relación Fg:Pg (mol:mol)	S ₀ Pg	S ₀ Fg
1:1	4,8	7,3
1:1,5	5,5	7,7
1:2	4,5	7,2
1:3	5,6	7,3

III.2.- INTERACCION PLASMINOGENO-FIBRINOGENO-FIBRINA.

ESTUDIOS EN PLASMA HUMANO

III.2.1.- Unión plasminógeno-coágulo de fibrina.

Aspectos macroscópicos

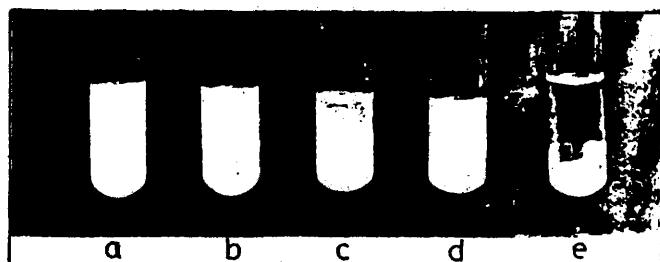
Coágulos de fibrina preparados a partir de plasma humano mediante adición al mismo de trombina y calcio, presentan macroscópicamente un aspecto amarillento y compacto después de su centrifugación, cuando se les mantiene en su propio suero, y más blanquecino tras someterles a lavado exhaustivo (Lámina 2A).

El volumen de los coágulos representa aproximadamente un 5-6% del volumen inicial de la mezcla. El tamaño de los mismos es de $0,4 \pm 0,1$, $0,9 \pm 0,1$, $1,4 \pm 0,1$ cm para 0,25, 0,50 y 1 ml de plasma respectivamente, como se indica en la Lámina 2B.

Para comprobar el grado de estabilización de los mismos, se realizó un estudio por electroforesis en geles de po-

LAMINA 2

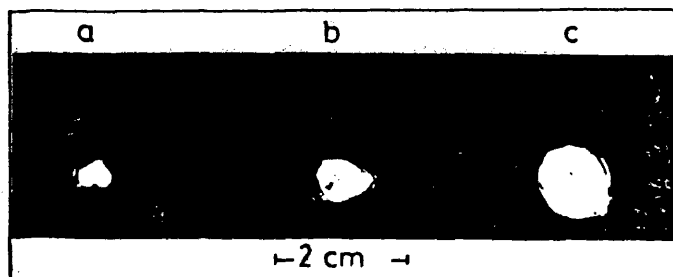
Aspectos macroscópicos de coágulos de plasma humano



A

Coágulos de plasma (1 ml)

- a - Coágulo sin manipular
- b - Coágulo despegado
- c - Coágulo retraído
- d - Coágulo retraído en suero
- e - Coágulo retraído en tampón



B

Coágulo retraído

- a - 0,25 ml plasma
- b - 0,50 ml plasma
- c - 1 ml plasma

liacrilamida al 5% en presencia de 0,1% de SDS, previa reducción con mercaptoetanol.

El densitograma de las muestras se puede observar en la Figura 11. Para obtener valores de masas moleculares de las distintas bandas electroforéticas en función de su desplazamiento, se han sometido al mismo tratamiento proteínas conocidas, representando su movilidad frente al logaritmo decimal de su masa molecular. Las bandas se corresponden con cadenas β , dímeros γ - γ y polímeros de cadena α , lo cual es indicativo del grado de polimerización (146).

En coágulos con las características descritas, formados a partir de 0,25, 0,50 y 1 ml de plasma, se ha cuantificado por métodos analíticos (sustrato S-2251) y radiactivos (^{125}I -Pg), la cantidad de plasminógeno unido al coágulo de fibrina.

Los valores de plasminógeno detectados en suero (no unidos al coágulo) por medio del sustrato S-2251 son en porcentaje del orden del 89-90 del contenido en plasma. Esto representa un 10-11% de plasminógeno unido a la fibrina.

Los valores obtenidos por radiactividad, utilizando ^{125}I -Pg, vienen expresados en la Tabla XII. En A, se contó radiactividad del coágulo sin previo lavado del mismo; en B, tras lavado parcial, y en C, tras lavado exhaustivo (vease Métodos).

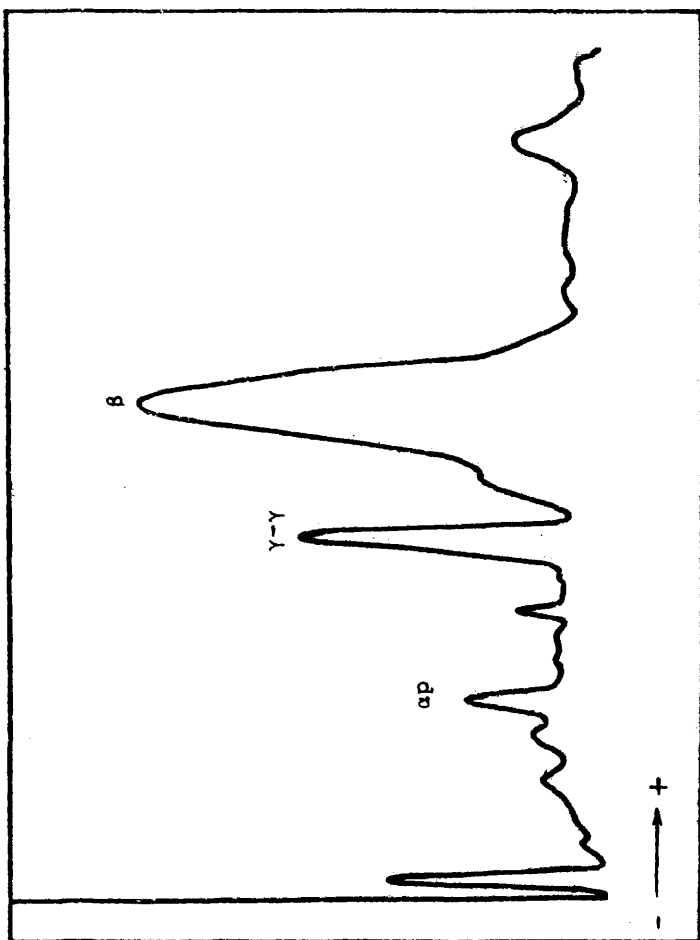


FIGURA 11

Perfiles electroforéticos de muestras reducidas de coágulos plasmáticos. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 5% en presencia de SDS.

TABLA XII

Plasminógeno unido y no unido a fibrinógeno
(fibrina) plasmático.

	A	B	C
Suero	89-90 (S-2251) 89-90 *	-	-
¹²⁵ I-Pg Coágulo de fibrina	10-11*	8*	6-7*

* Valores obtenidos utilizando $^{125}\text{I-Pg}$.

III.2.2.- Determinación de la constante aparente de
disociación plasminógeno-fibrina

La adición de cantidades crecientes de $^{125}\text{I-Pg}$ a un volumen constante (0,5 ml) de plasma, antes de coagular, ha permitido determinar los parámetros de asociación del plasminógeno en los coágulos de fibrina.

En la Tabla XIII se recoge el suplemento de plasminógeno añadido al plasma y el porcentaje de plasminógeno unido a la fibrina.

TABLA XIII

Fg (μM)	Pg (μM)	Suplemento Pg (%)	Pg unido (%)
3	1,1	0	10-11
	1,51	37,5	13-10
	1,92	75	11-12
	2,33	112	12-11
	2,75	150	15-12

Con estos valores, y considerando dos el número de sitios de unión en fibrinógeno para el plasminógeno, se ha estimado por el método de la representación doble recíproca la constante aparente de disociación del equilibrio $Pg \rightleftharpoons Fn$ (plasma), siendo ésta de $K_d = 4,8 \times 10^{-5} M$.

III.2.3.- Intercambio plasminógeno plasmático

¹²⁵I-plasminógeno

La mezcla plasminógeno marcado y plasma se ha dejado en incubación de 30 min a 4 h, antes de añadir trombina y calcio para formar el coágulo de fibrina.

Se ha observado que el intercambio entre el plasminógeno plasmático y el ¹²⁵I-Pg ocurre de manera rápida e irreversible. El plasminógeno unido al coágulo sin previo lavado del mismo presenta un valor constante de 9,6 a 11%, tanto a los 30 min como a las 4 horas de incubación.

III.3.- MECANISMO DE ACCION: ESTUDIOS CINETICOS DE FIBRINOLISIS EN SISTEMA PURIFICADO

III.3.1.- Lisis de coágulos por activación externa del plasminógeno: distintos modelos.

Se ha comparado la actividad del plasminógeno en la fibrinólisis, cuando éste se encuentra localizado: dentro (retenido en el coágulo), fuera (añadido después de retraído el coágulo) y mitad dentro-mitad fuera del coágulo de fibrina, al acti-

varlo con estreptoquinasa o uroquinasa desde el exterior del mismo.

El estudio se ha realizado con coágulos de fibrina preparados a partir de 1 ml de disolución que tenían concentraciones de fibrinógeno entre 1,4 y 5,8 μM y concentraciones de plasminógeno entre 0,055 y 2,2 μM , en relaciones plasminógeno/fibrinógeno (p/p) de 1/200 a 1/10.

La Figura 12 muestra los valores de la cantidad de fibrina lisada con respecto al total, expresada en porcentaje del total de fibrina, al activar con estreptoquinasa, y la Figura 13 con uroquinasa en los tres modelos indicados.

Se ven tres zonas diferentes, una que corresponde al tiempo de latencia o tiempo en el cual aún no se han liberado apenas productos de degradación de la estructura de fibrina y por lo tanto no hay detección apreciable de lisis; otro tramo lineal que corresponde a la liberación constante de péptidos y una tercera zona en la cual o bien se ha llegado a lisis total o la actividad de la enzima comienza a decaer.

En todas las relaciones plasminógeno/fibrinógeno (p/p) estudiadas, se han observado comportamientos cinéticos similares de los tres modelos, mostrando siempre una mayor eficacia en la lisis los coágulos con el plasminógeno dentro del mismo.

También, en todos los casos estudiados la velocidad de lisis observada es menor al activar con uroquinasa que con estreptoquinasa.

Las Tablas XIV y XV recogen los valores de velocidad

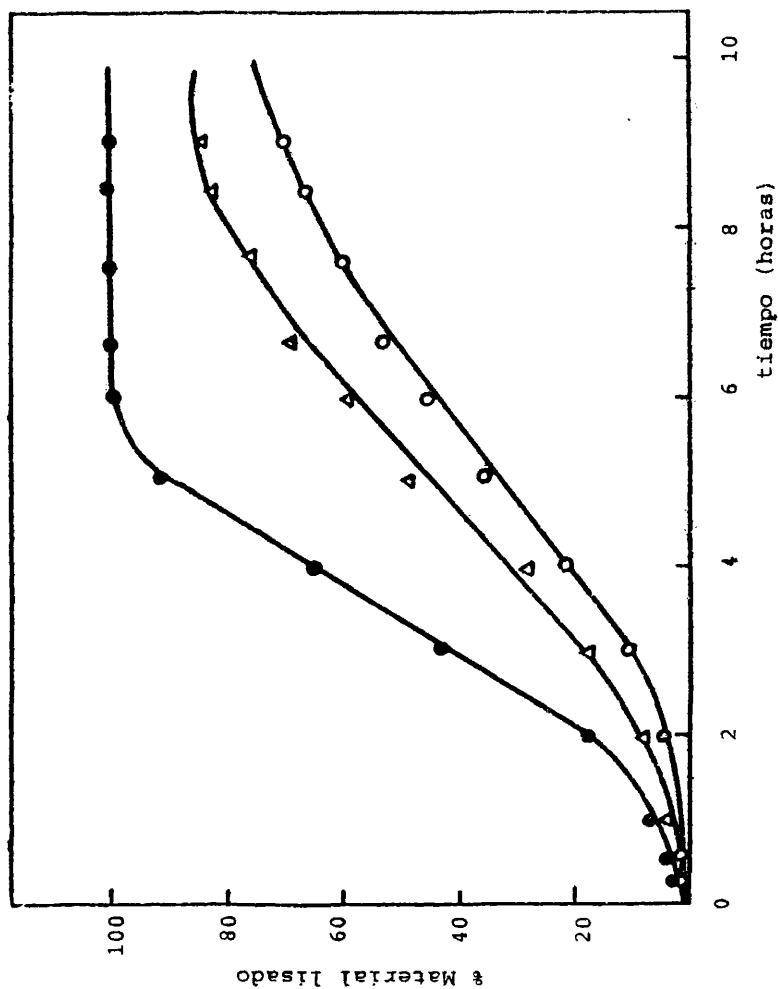


FIGURA 12

Cinéticas de lisis de coágulos de fibrina por activación externa del Pg con SK. Relación Pg/Fg 1/10 (p/p). Pg retenido intra-coágulo (●), Pg 50% intra - 50% extra-coágulo (Δ). Pg extra-coágulo (○).

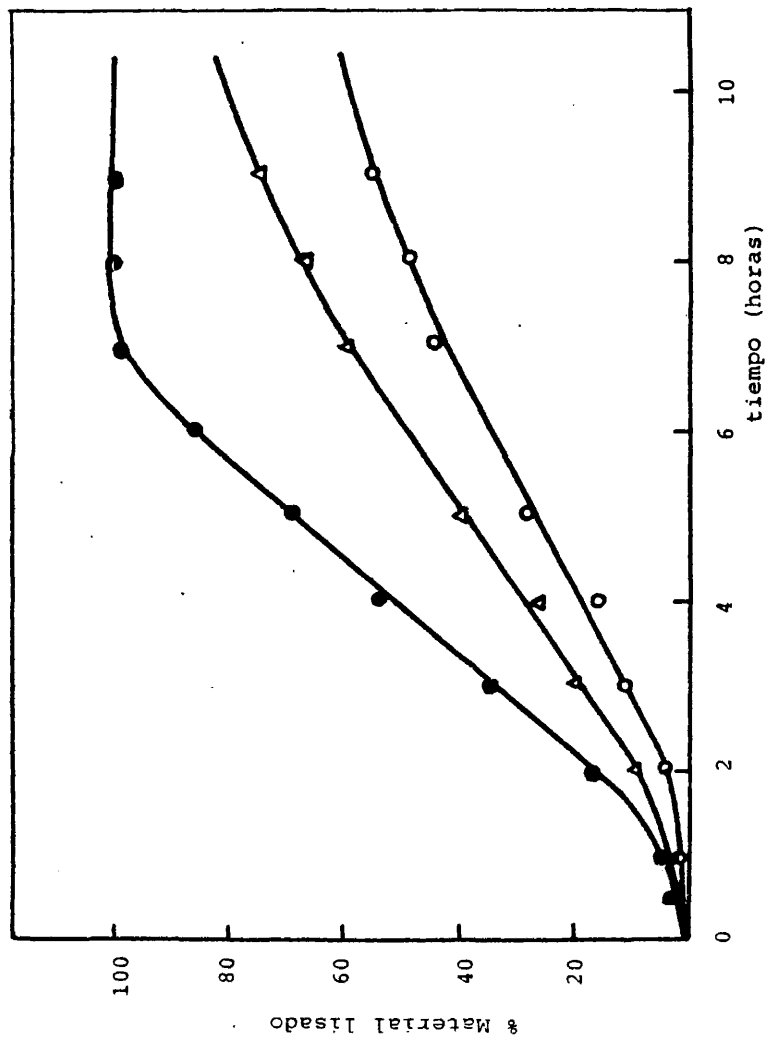


FIGURA 13

Cinéticas de lisis de coágulos de fibrina por activación externa del Pg con UK. Relación Pg/Fg 1/10 (p/p). Plasminógeno retenido intra-coágulo (●), Pg 50% intra-coágulo - 50% extra-coágulo (Δ), Pg extra-coágulo (O).

TABLA XIV

Lisis de coágulos de fibrina con plasminógeno
activado con estreptoquinasa.

	Tiempo latencia (horas)	velocidad	
		%/h	mg/h
Pg dentro	1,5	24	0,24
Pg dentro- fuera	1,5	12	0,12
Pg fuera	1,5	10	0,10

TABLA XV

Lisis de coágulos de fibrina con plasminógeno
activado con uroquinasa.

	Tiempo latencia (horas)	velocidad	
		%/h	mg/h
Pg dentro	1,5	18	0,18
Pg dentro- fuera	1,5	10	0,10
Pg fuera	1,5	7,5	0,075

de lisis (cantidad de fibrina lisada por unidad de tiempo) en los tres modelos indicados, al activar con estreptoquinasa en una relación estreptoquinasa/plasminógeno (p/p) de 1/2, lo que equivale a 4 unidades de activador por unidad caseinolítica de plasminógeno (Tabla XIV) y con uroquinasa en la misma relación de unidades (Tabla XV), para una concentración 2,9 μ M de fibri-

nógeno y relación plasminógeno/fibrinógeno (p/p) de 1/10.

Efecto de la concentración de plasminógeno

Estudios cinéticos de lisis de coágulos con plasminógeno no adsorbido, activando desde el exterior con el activador estreptoquinasa en una relación estreptoquinasa/plasminógeno (p/p) de 1/2; manteniendo constante la cantidad de fibrinógeno y para cantidades variables de plasminógeno, muestran que la velocidad de lisis es proporcional a la cantidad de plasminógeno añadido y que a partir de una relación plasminógeno/fibrinógeno (p/p) de 1/50, la velocidad no experimenta ningún aumento.

En la Tabla XVI vienen recogidos los valores de velocidad máxima de lisis de coágulos de fibrina obtenidos a partir de una concentración de fibrinógeno 2,9 μ M.

La figura 14 muestra el porcentaje de material lisado transcurridas 2,5, 3 y 5 horas después de la adición del activador para relaciones distintas plasminógeno/fibrinógeno (p/p).

TABLA XVI

Lisis de coágulos de fibrina para una concentración fija de fibrinógeno y cantidades variables de plasminógeno en el medio antes de coagular. Activando desde el exterior con estreptoquinasa.

Pg μ g	Relación Pg:Fg (p/p)	Velocidad mg Fn/h
5	1:200	0,10
10	1:100	0,15
15	1:75	0,20
20	1:50	0,25
50	1:20	0,25
100	1:10	0,25

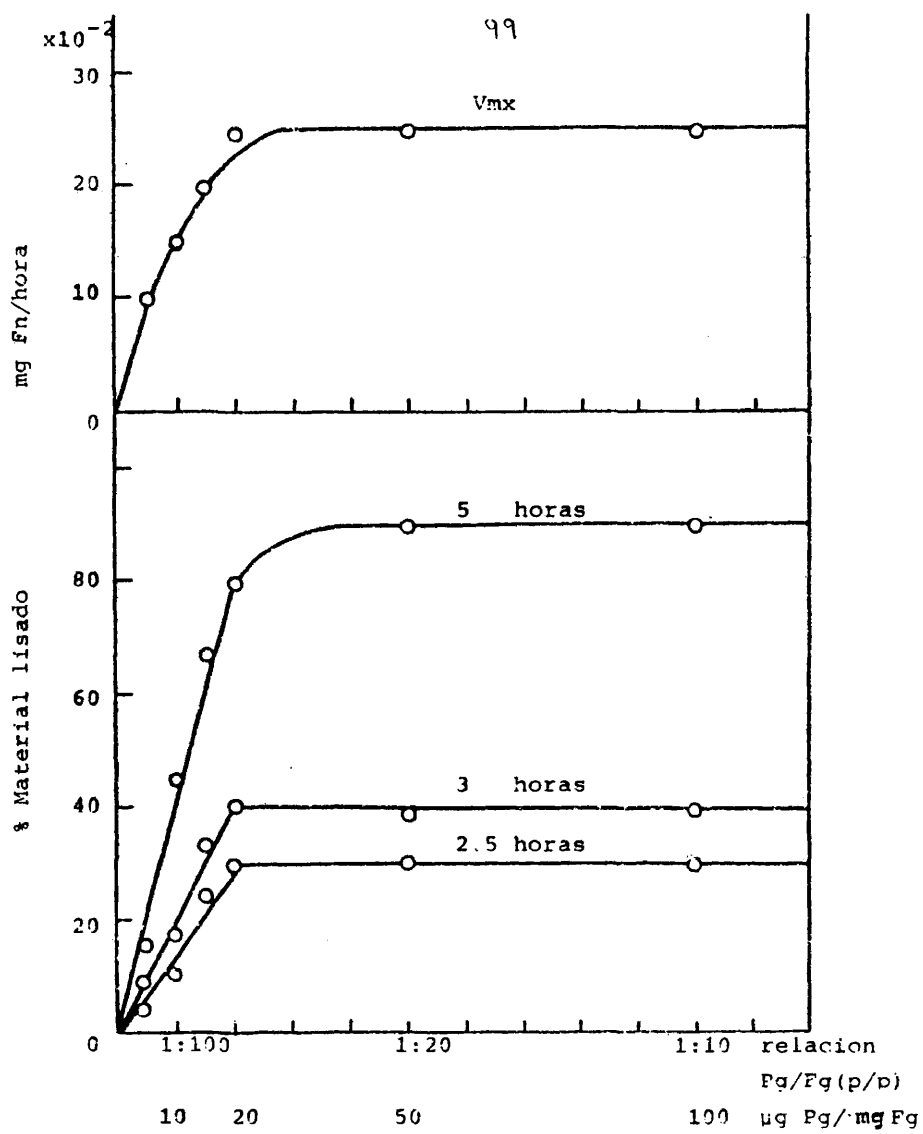


FIGURA 14

Efecto de la concentración de plasminógeno en la lisis de coágulos de fibrina, manteniendo constante la relación Ac/Pg.

Efecto de la concentración de activador

Estudios cinéticos realizados con plasminógeno adsorbido en el coágulo y activando desde el exterior con cantidades variables de estreptoquinasa muestran que la velocidad de lisis es proporcional a la cantidad de activador.

La lisis de coágulos formados a partir de una concentración 2,9 μ M de fibrinógeno y a los que se les ha añadido plasminógeno en una relación plasminógeno/fibrinógeno (p/p) de 1/100 y de 1/50 activándolo con tres cantidades de estreptoquinasa distintas, muestran un comportamiento general semejante. Sin embargo, para cantidades de activador de 8 unidades/uni. ca sein. de plasminógeno, el tiempo de latencia se acorta considerablemente. La Figura 15 recoge el porcentaje de material lizado al cabo de 3 horas de haberse añadido el activador a la disolución que contenía el coágulo.

III.3.2.- Acción de los inhibidores del plasma sobre la lisis de coágulos de fibrina

Se ha estudiado la acción de los inhibidores procedentes de un suero normal y de un suero con un contenido en antiplasminas disminuido, diluido 50 veces (vease Métodos), sobre la lisis de coágulos de fibrina con plasminógeno adsorbido.

En la Figura 16 se recogen los resultados obtenidos utilizando una concentración de fibrinógeno 2,9 μ M y una relación plasminógeno/fibrinógeno (p/p) de 1/75, activando la lisis

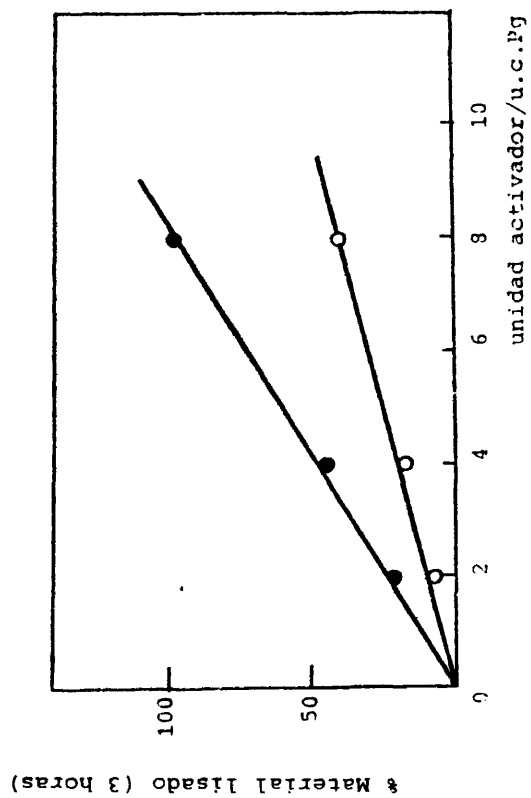


FIGURA 15

Efecto de dosis variables de activador (SK) en la lisis de fibrina.

Relación Pq/Fg (p/p) 1:50 (●) y 1:100 (○).

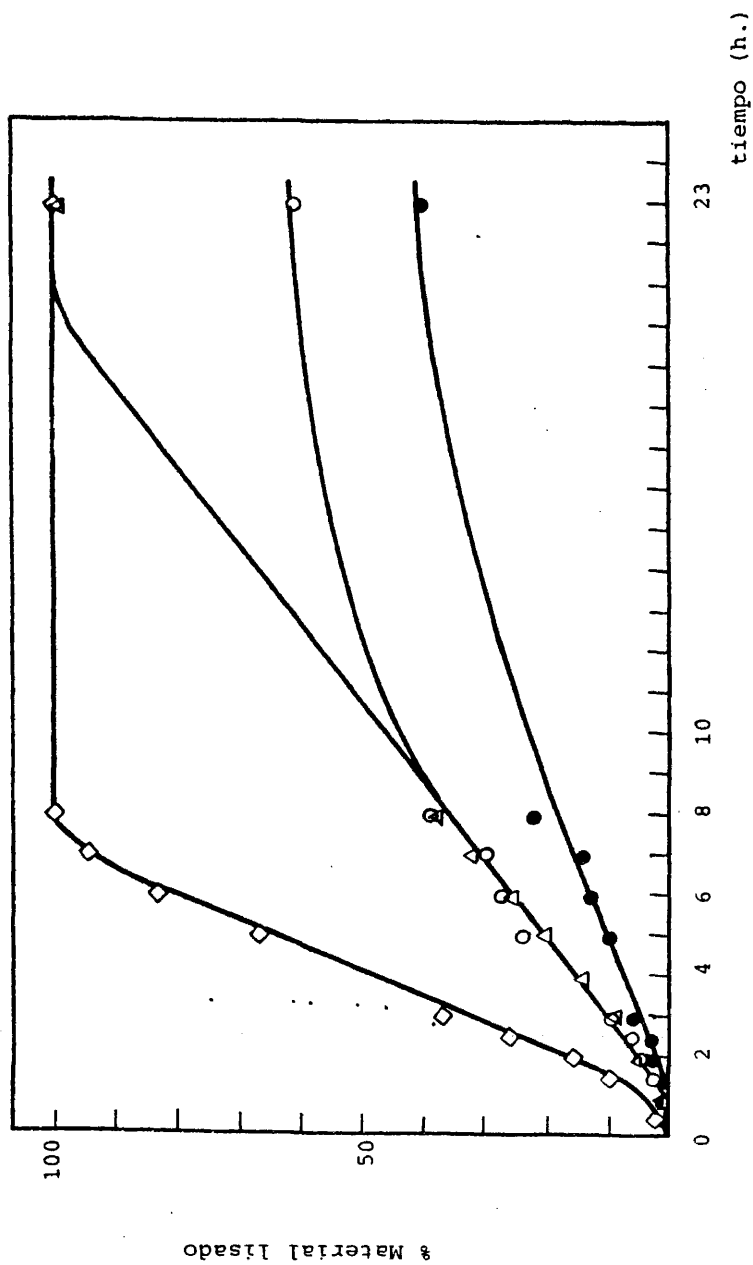


FIGURA 16

Efecto de los inhibidores naturales en la lisis de coágulos de fibrina: Inhibidores retenidos intra-coágulo de suero normal (○) y de un suero disminuido (△). Inhibidores extra-coágulo de suero normal (●) y de suero disminuido (◇). Ausencia de I (◇).
Relación Pg/Fg (p/p) 1/75.

con estreptoquinasa desde el exterior del coágulo.

Cuando los inhibidores son solo los englobados en el coágulo, se observa que la inhibición es ligeramente más pequeña que cuando éstos se han añadido una vez formado el coágulo. Cuando se utiliza suero disminuido, se observa que la inhibición es menor que con suero normal y que la velocidad de lisis es la misma cuando el coágulo se ha obtenido en presencia de suero disminuido que cuando éste se añade al coágulo una vez formado.

Los resultados de la lisis de coágulos de fibrina con los inhibidores de suero diluidos en la relación 1/50 (v/v) retenidos dentro del coágulo se han comparado para concentraciones distintas de activador (de 4 unidades a 12 unidades por unidad caseinolítica de plasminógeno), produciéndose tanto con estreptoquinasa como con uroquinasa un aumento proporcional en la velocidad de lisis (Figura 17).

III.4.- MECANISMO DE ACCION: ESTUDIOS CINETICOS DE FIBRINOLISIS EN PLASMA HUMANO

III.4.1.- Lisis de coágulos naturales por activación externa

Se han realizado estudios de fibrinólisis en coágulos de fibrina obtenidos a partir de distintos volúmenes de plasma humano normal, activándolos desde el exterior con dosis variables de activador.

Paralelos a estos estudios se han realizado cinéticas

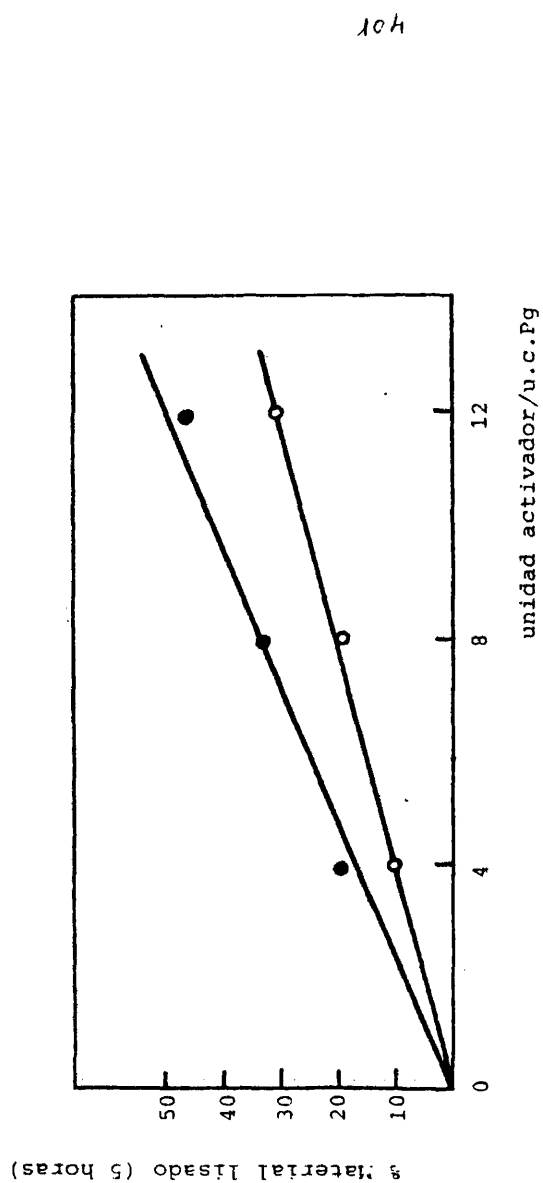


FIGURA 17

Efecto de dosis variables de activador estreptoquinasa (●) y uroquinasa (○) en la lisis de coágulos de fibrina obtenidos en presencia de inhibidores. Relación Pg/Fg (p/p) 1/75.

de lisis de coágulos de plasma reconstituidos (vease Métodos).

La lisis se ha seguido determinando la fibrina que permanece insoluble después de un cierto tiempo de incubación desde que se activó el plasminógeno. La cantidad de proteína que constituye el resto de coágulo se mide después de degradarlo con tripsina.

En la Figura 18 vienen expresados los valores de lisis (porcentaje de material lisado) en función del tiempo, para coágulos de 0,25 ml de volumen de plasma normal, activándolos en su propio suero (S) o en tampón (T) tras lavado exhaustivo del mismo con 25 μ l de estreptoquinasa (4 unidades/unidad caseinolítica de plasminógeno), Figura 18A; con uroquinasa en las mismas condiciones (Figura 18B) y con plasma reconstituido y estreptoquinasa (Figura 18C).

Se observa una mayor eficacia en la inhibición en presencia del propio suero respecto a los coágulos en tampón, con relaciones en las velocidades de lisis de 1,3 a 1,5 según sea estreptoquinasa o uroquinasa. Sin embargo, se observaron velocidades de lisis, en estas condiciones, más próximas a la situación "in vivo", velocidades por otra parte muy parecidas activando con estreptoquinasa o con uroquinasa, $V_{SK}/V_{UK} = 1,15$.

Finalmente, no se han encontrado diferencias significativas en la velocidad de lisis en un coágulo de plasma reconstituido (PR) (Tabla XVII).

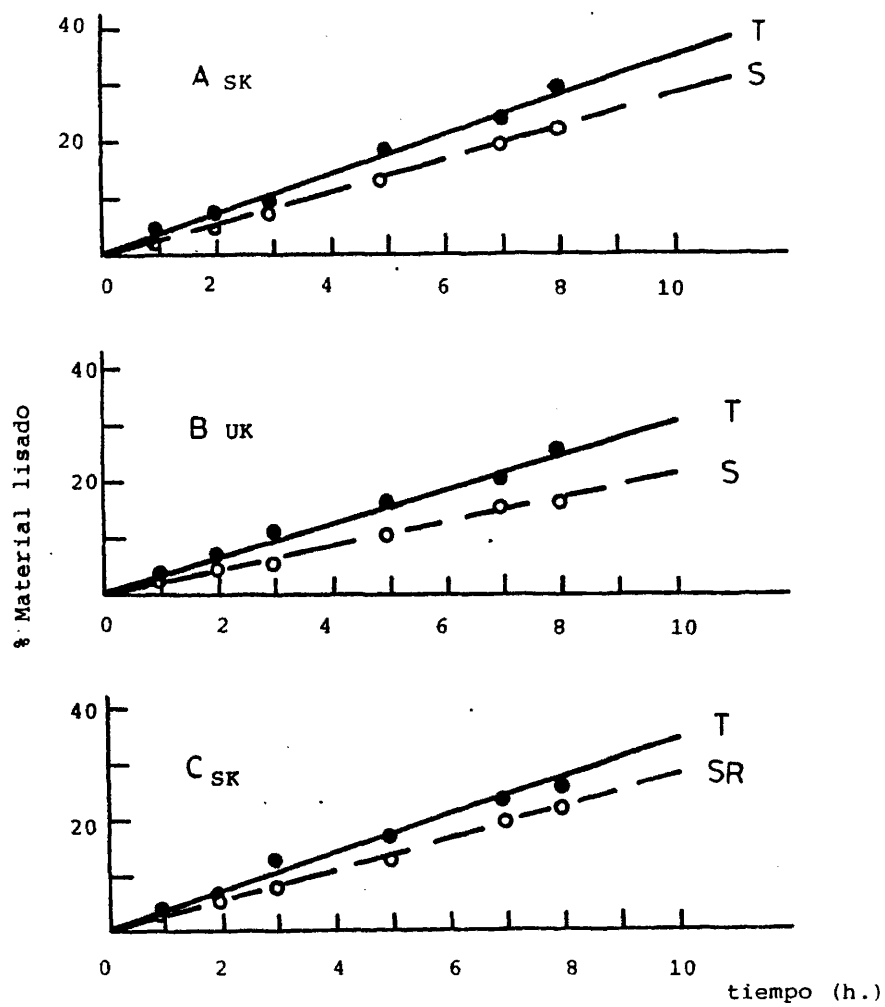


FIGURA 18

Cinéticas de lisis de coágulos de plasma normal (A, B) y de plasma reconstituido (C) por activación externa con estreptoquinasa y uroquinasa en su propio suero (S, SR) o en tampón (T) .

TABLA XVII

		Velocidad (%/hora)	
		Plasma	P.R.
SK	Tampón	3,56	3,5
	Suero	2,81	2,8
UK	Tampón	3,12	-
	Suero	2,13	-

Efecto de la concentración de activador

La lisis de coágulos de plasma activados en tampón o en su propio suero no varía con la concentración de activador (estreptoquinasa o uroquinasa), para valores de más de 4 unidades por unidad caseinolítica de plasminógeno, existentes antes de la coagulación; a partir de los cuales la velocidad se hace constante (Figura 19).

III.4.2.- Efecto de la concentración de plasminógeno
en la lisis de coágulos de plasma

Se han preparado coágulos de plasma normal (como se indicó en Métodos) al que se han añadido cantidades crecientes de plasminógeno antes de coagular.

El resultado de la cinética de lisis, seguido por digestión con tripsina, tras lavado exhaustivo y activación externa con estreptoquinasa de los coágulos, viene representado gráficamente en las Figuras 20 y 21 para coágulos de 0,25 ml de

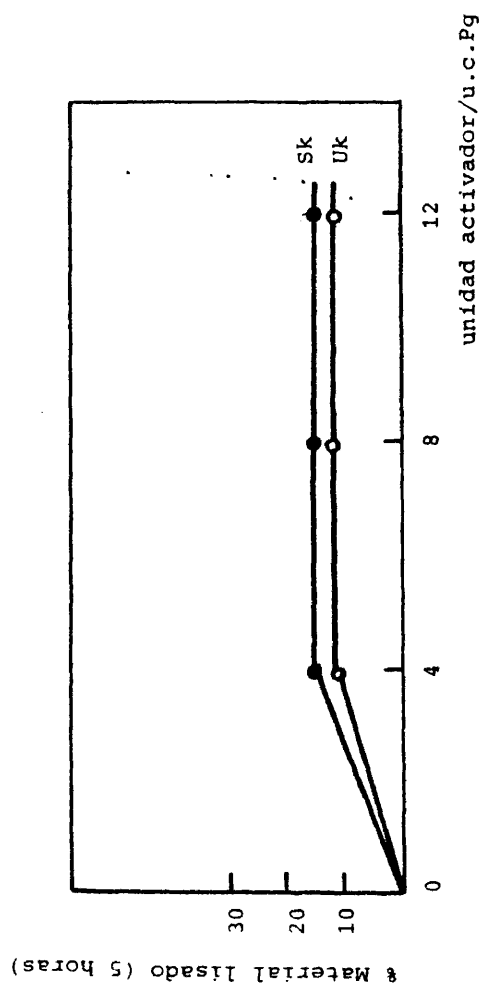


FIGURA 19

Efecto de dosis variables de activador, SK (●) y UK (○), de la lisis de coágulos plasmáticos.

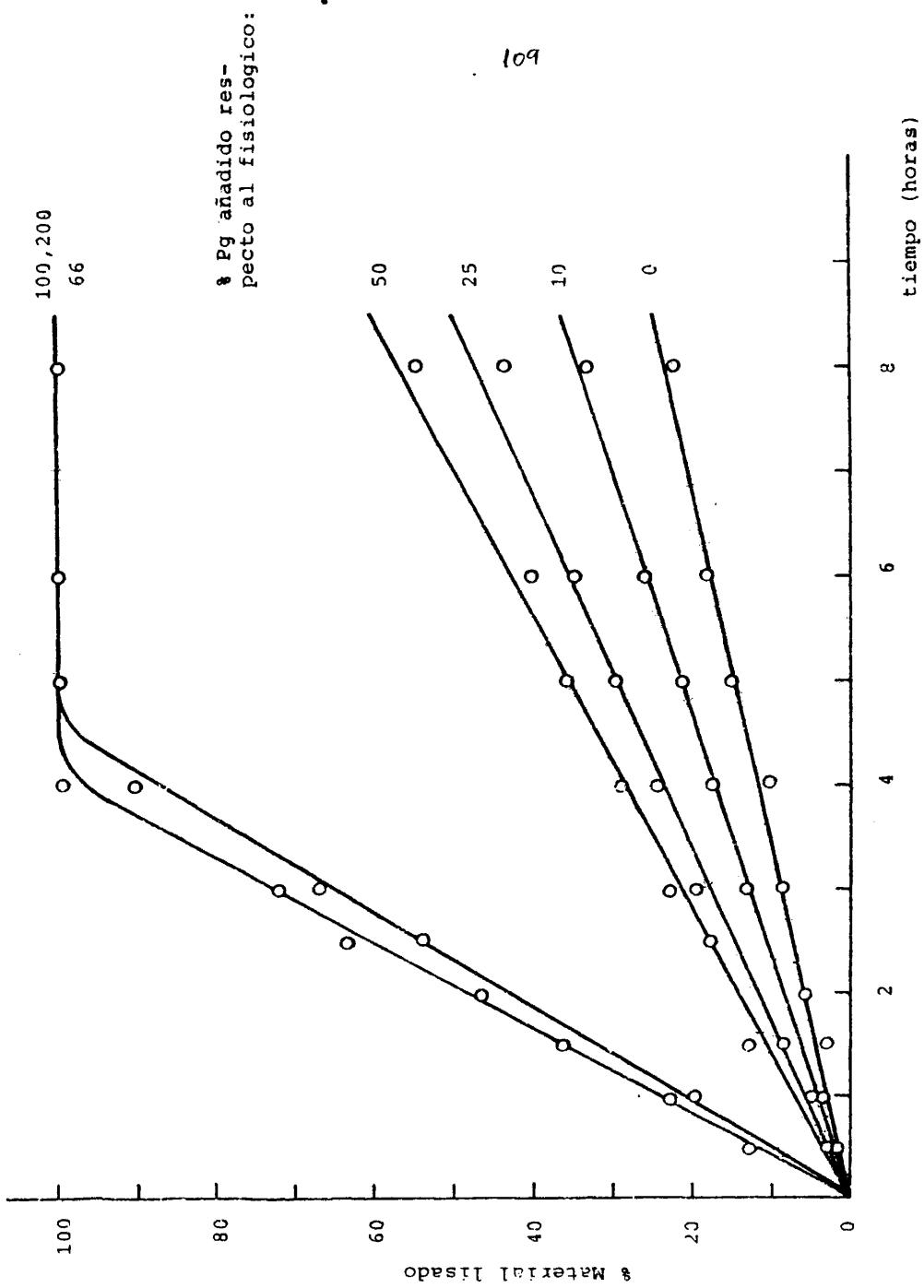


FIGURA 20 - Plasma con cantidades crecientes de Pg

110

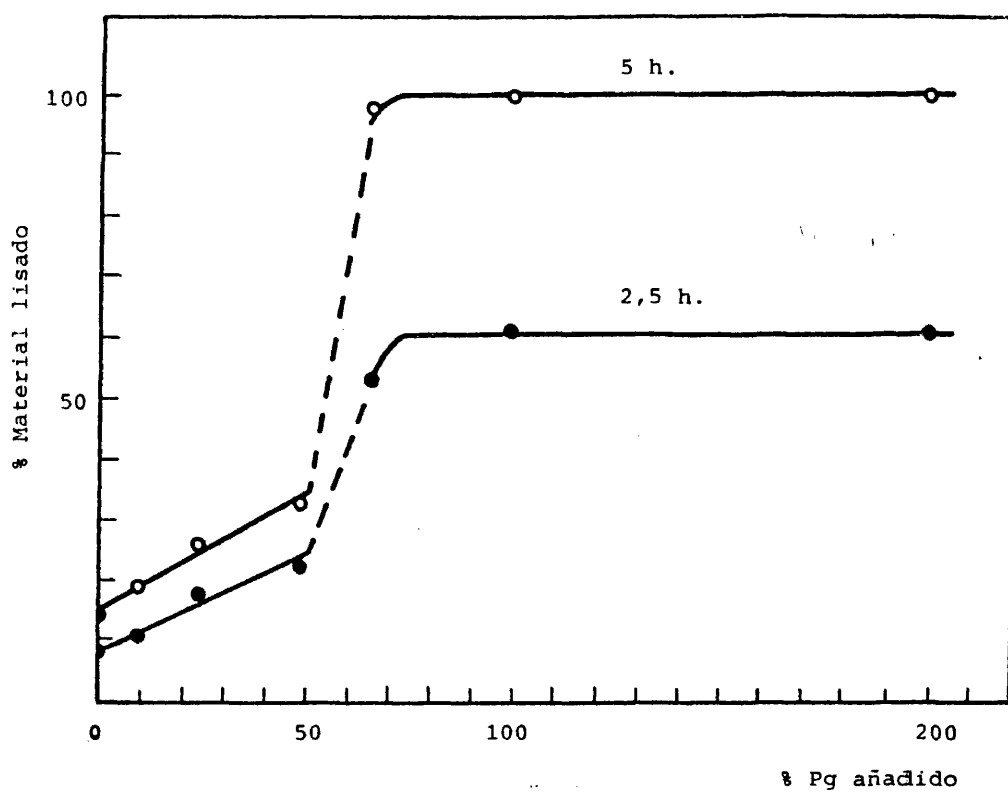


FIGURA 21

Influencia de la cantidad de plasminógeno añadido al plasma, antes de coagular, en la lisis de coágulos plasmáticos

plasma.

Se puede observar que a partir de un valor de plasminógeno añadido próximo al 66-70% del plasminógeno presente en plasma (suponiendo una relación nativa de 1:10), la velocidad de lisis aumenta bruscamente alcanzándose un valor constante, incluso para cantidades de 100% a 200% de plasminógeno añadido respecto al fisiológico. La velocidad de lisis que se alcanza es comparable a la que se observó en coágulos de fibrina (sistema purificado) en ausencia completa de inhibidores para una relación 1:10. plasminógeno/fibrinógeno (p/p) de 1/10.

III.5.- ESTUDIOS DE LA LISIS DE COAGULOS PLASMATICOS EN FUNCION DE SU GRADO DE ENVEJECIMIENTO

III.5.1.- Estudios cinéticos de lisis por activación extrínseca de coágulos de distintas "edades"

Se ha estudiado la capacidad de fibrinolisis, inducida con estreptoquinasa, en coágulos estabilizados obtenidos de plasma humano, a distintos tiempos o "edades" desde la formación y retracción del coágulo.

En la Figura 22 están representados los resultados de las cinéticas de lisis, seguidas por digestión con tripsina, de la fibrina insoluble no lisada, de coágulos plasmáticos (0,25 ml de volumen) de "edades" comprendidas entre 0 y 66 horas. Los resultados muestran una disminución en la velocidad de lisis con la edad del coágulo que es pequeña hasta 18 h ($v_{18} = 0$ siendo v_0 la velocidad máxima de lisis de un coágulo recién formado).



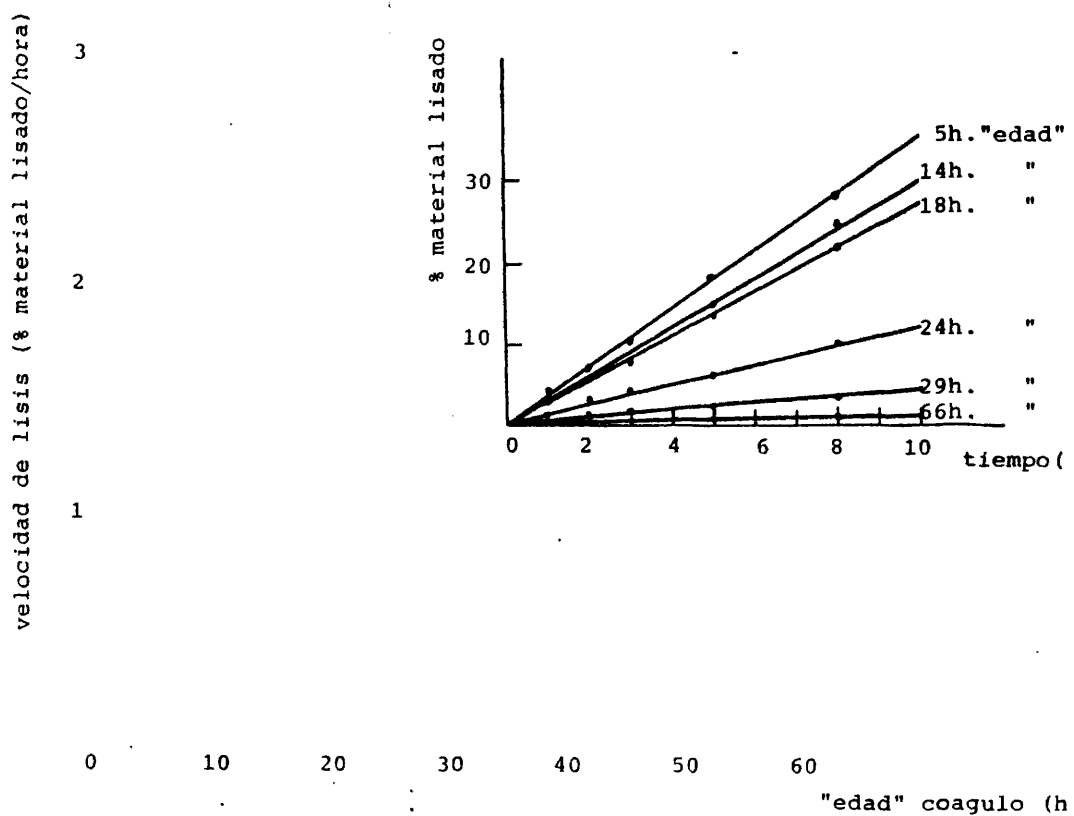


FIGURA 22

Decaimiento de la velocidad de lisis de coágulos plasmáticos, en función de su "edad" o grado de envejecimiento.

(edad 0); para caer rápidamente a continuación ($v_{24} = 0,3 v_0$) y anularse prácticamente a 36 h.

III.5.2.- Estudios de la unión de plasminógeno al coágulo de fibrina en función de su "edad"

Se han preparado coágulos de fibrina estabilizada a partir de cantidades variables de plasma (0,25, 0,50 y 1 ml) tras adición al mismo de trombina e iones calcio. Después de la retracción, por centrifugación y lavado exhaustivo de los coágulos, éstos se han sumergido en un volumen grande (100 ml) de suero o tampón. El aspecto de los mismos transcurridas 24 y 48 h es semejante macroscópicamente al de coágulos recién preparados (Láminas 3 y 4).

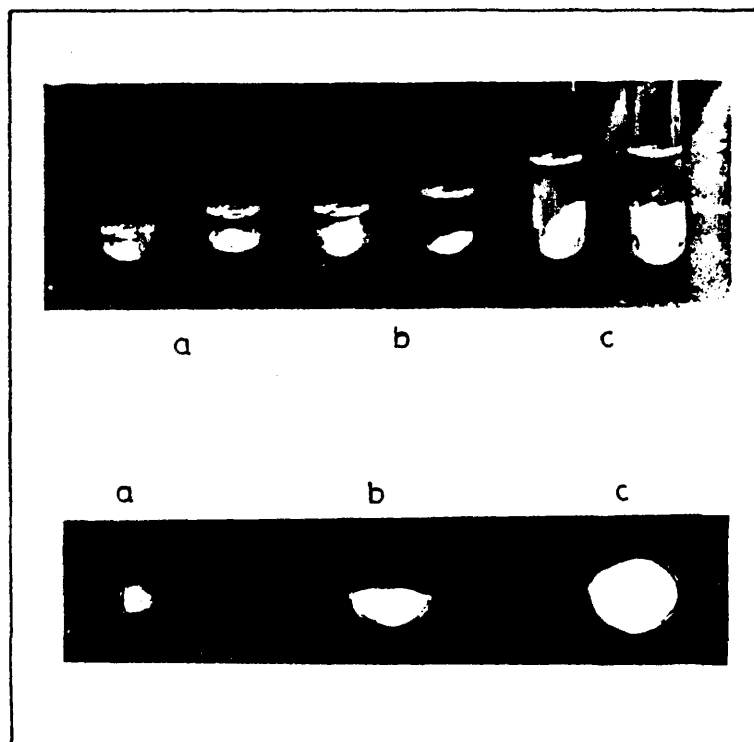
El grado de estabilización de estos coágulos de distintas "edades" se ha comprobado, después de disolverlos por reducción total en β -mercaptoetanol, por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% en presencia de 0,1% de dodecil sulfato sódico.

El densitograma de las muestras fué similar al obtenido con coágulos plasmáticos recientes (Figura 11) que como ya se indicó, presentaba bandas electroforéticas identificadas como dímeros γ - γ y polímeros $\alpha\alpha$, lo cual es indicativo de un alto grado de estabilización.

La unión del plasminógeno al coágulo en función de su "envejecimiento" se ha realizado por medidas de radiactividad utilizando ^{125}I -plasminógeno.

LAMINA 3

Aspectos macroscópicos de coágulos de
plasma humano: 24 horas de edad

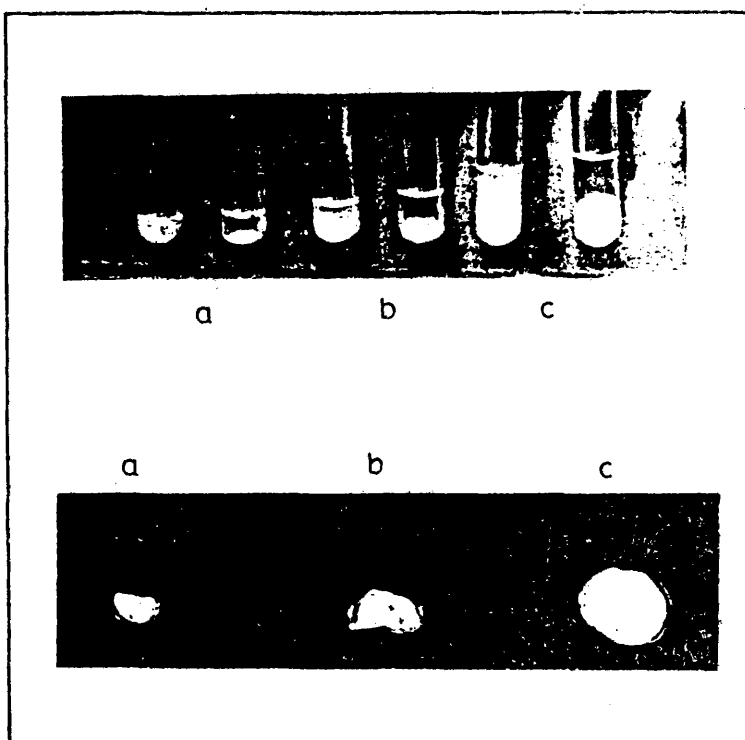


Coágulos retraídos en su propio suero
y en tampón

- a - 0,25 ml plasma
- b - 0,50 ml plasma
- c - 1,0 ml plasma

LAMINA 4

Aspectos macroscópicos de coágulos de
plasma humano: 48 horas de edad



Coágulos retraídos en su propio suero
y en tampón

- a - 0,25 ml plasma
- b - 0,50 ml plasma
- c - 1,0 ml plasma

La cuantificación del plasminógeno que permanece unido al coágulo transcurridas de 4 a 24 horas de haber estado sumergidos en cantidad abundante de suero, mostró que del plasminógeno presente en el coágulo, tras lavado exhaustivo del mismo, transcurridas las 4 primeras horas quedaba el 60%, a las 22 horas el 40% y únicamente el 25% a las 24 horas.

Existe pues una pérdida de plasminógeno con el tiempo desde el interior del coágulo al medio, que dadas las condiciones de experimentación, se podría definir como "difusión libre" (Tabla XVIII).

TABLA XVIII

Tiempo (h)	0	4	18	22	24
% Pg que difunde	0	40	43	60	75

Se puede ver que el tiempo crítico de salida del plasminógeno desde el interior del coágulo al medio transcurre entre las 18 y las 24 horas, observándose un paralelismo entre la pérdida de capacidad de lisis y las cantidades decrecientes de plasminógeno que retienen los coágulos (Figura 23).

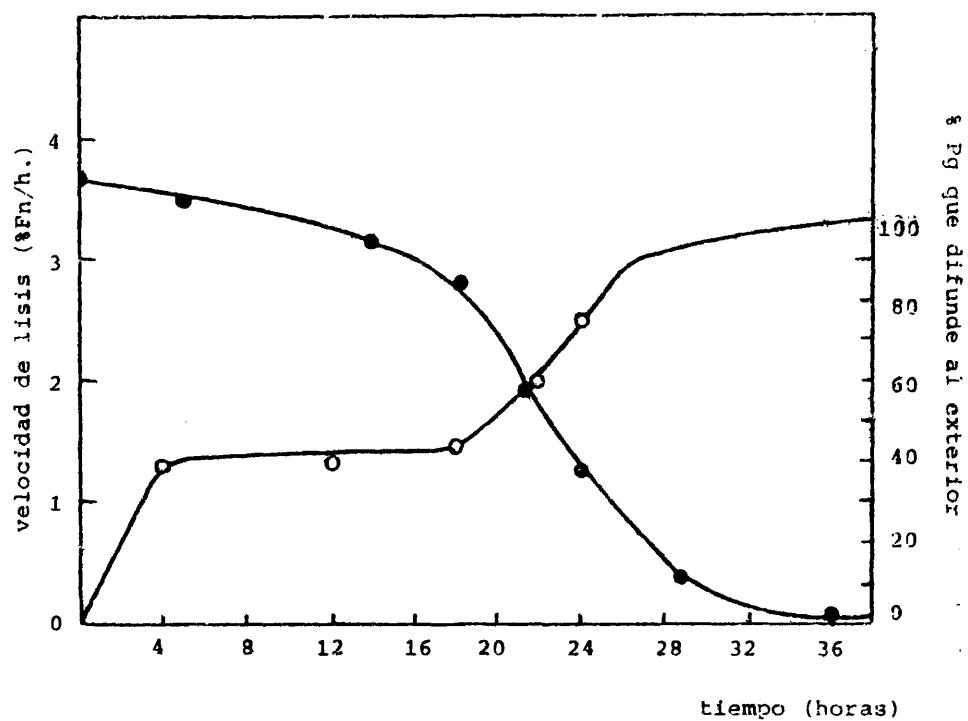


FIGURA 23

Paralelismo entre el decaimiento de la velocidad de lisis (●) y la difusión de plasminógeno (○).

118

CAPITULO IV.- D I S C U S I O N

El mecanismo de acción del sistema fibrinolítico es una de las cuestiones sin resolver más controvertidas y de mayor transcendencia en la patología del sistema cardiovascular. Actualmente se consideran múltiples hipótesis al respecto entre las que sobresalen: Unión selectiva del plasminógeno a la fibrina (Alkjaersig, Fletcher y Sherry) (103). Unión selectiva del activador del plasminógeno a la fibrina (Chesterman, Allington y Sharp) (105).

Tras el descubrimiento de la α -antiplasmina y la unanimidad al considerarla el principal y más rápido inhibidor de la plasmina, la hipótesis de que la fibrina disocia a los complejos plasmina inhibidores (Ambrus y Markus) (104), ha sido descartada.

Las hipótesis vigentes no son mutuamente excluyentes sino que todas ellas, aunque con distintas interpretaciones, coinciden en considerar el plasminógeno que permanece unido o adsorbido al coágulo de fibrina, como el más importante en la lisis.

Recientemente, Collen ha planteado un modelo molecular para la fibrinolisis fisiológica cuya base radica en la afinidad del plasminógeno (plasmina) hacia la fibrina (106).

El presente trabajo, ha realizado un estudio con fi-

brinógeno puro de tres modelos de acción del sistema plasminógeno-plasmina, con el fin de obtener información sobre la eficacia del plasminógeno en relación con su lugar de acción. Para cuantificar y apoyar fisicoquímicamente estos trabajos se realizaron paralelamente estudios sobre la interacción plasminógeno-fibrinógeno-fibrina.

Los resultados obtenidos en los tres modelos siguientes:

- a) Con el plasminógeno presente antes de coagular el fibrinógeno.
- b) Con el 50% de plasminógeno presente antes de coagular y el restante 50% añadido después de obtener el coágulo.
- c) Con el plasminógeno añadido después de coagular y retraer el coágulo,

indican que la lisis es más rápida con el sistema a) seguido por el b) y siendo el c) el más lento.

Esto demuestra que independientemente de las hipótesis sugeridas como mecanismo fisiológico, el plasminógeno es más eficaz cuando está localizado en el interior del coágulo. Hecho que se cumple para todos los casos estudiados en este trabajo, utilizando concentraciones de plasminógeno de 0,055 a 2,2 μ M y para relaciones plasminógeno/fibrinógeno (p/p) de 1/200 a 1/10 (las cuales incluyen las fisiológicas).

Los valores de velocidad máxima de lisis, expresados en mg de fibrina lisada por hora, para relaciones plasminógeno/fibrinógeno (p/p) de 1/10 y activando desde el exterior del coágulo con 4 unidades de activador por unidad caseinolítica de

plasminógeno, son 0,24 mg/h para el caso a); 0,12 mg/h para el b) y 0,10 mg/h para el c) cuando el activador utilizado es estreptoquinasa y 0,18, 0,10 y 0,075 cuando se activa con uroquinasa en los modelos a), b) y c) respectivamente.

Se observa que en las condiciones de estudio mencionadas la estreptoquinasa es un activador más eficiente que la uroquinasa.

Por otro lado, en el modelo con el plasminógeno presente antes de coagular y activando desde el exterior con una relación fija plasminógeno/estreptoquinasa (4 unidades activador por unidad caseinolítica de plasminógeno), la velocidad de lisis es proporcional a la cantidad de plasminógeno añadida hasta una relación plasminógeno/fibrinógeno (p/p) de 1/50, a partir de la cual la velocidad se hace constante. Esto indica que la eficacia del sistema va a venir regida no solamente por el lugar de acción o localización del plasminógeno y por la cantidad relativa de plasminógeno en el interior del coágulo sino probablemente también por el proceso de activación de la plasmina.

El aumento de la cantidad de activador en el modelo a) produce un aumento proporcional en la velocidad de lisis, lo que sugiere que esta velocidad depende tanto de la cantidad de plasminógeno adsorbido en el coágulo como de la cantidad de activador capaz de difundir al interior del mismo y originar plasmina.

Los procesos de lisis discutidos hasta ahora se originan mediante activación exógena del plasminógeno, utilizando como activadores estreptoquinasa y uroquinasa (ampliamente utili-

zados con fines terapéuticos y profilácticos (127)) y en un entorno carente de inhibidores. Con el fin de aproximarse gradualmente a unas condiciones más semejantes a las fisiológicas, se introdujo este otro factor, utilizando la acción inhibitoria del suero (148). Se emplearon los inhibidores procedentes de un suero normal y de un suero cuyos niveles de antiplasminas estaban disminuidos.

Los inhibidores presentes en ambos sueros (a una dilución 1/50 v/v) ejercen una potente acción inhibitoria sobre la lisis de coágulos de fibrinógeno purificados. Los resultados obtenidos implican que en el suero hay inhibidores que se adsorben al coágulo ejerciendo así su acción, pero que además hay otros, o los mismos inhibidores (antiplasminas) que pueden difundir al interior del coágulo ejerciendo su acción inhibitoria con tanta eficacia como el material adsorbido.

La acción conjunta de activadores e inhibidores (cuando los inhibidores son los englobados en el coágulo) muestra un aumento proporcional en la velocidad de lisis (de un 20% de material lisado a las 5 h a un 40%) al incrementar la dosis de activador de 4 unidades a 12 unidades de estreptoquinasa por unidad caseinolítica de plasminógeno, lo que confirma la importancia del proceso de activación de la plasmina en la eficacia de la lisis.

El proceso global de lisis vendrá pues regido por los siguientes procesos parciales:

1. a) Adsorción del plasminógeno:

Interacción fibrina con el plasminógeno.



2. Proceso de activación del plasminógeno:

a) Difusión del activador.

b) Interacción activador-plasminógeno.



3. Fibrinolisis.



4. Proceso de inhibición:

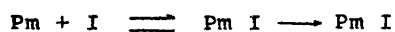
a) Adsorción de los inhibidores de la plasmina:

Interacción fibrina con los inhibidores.



b) Difusión de los inhibidores al interior del coágulo:

Interacción de los inhibidores con el plasminógeno y plasmina.



El estudio de la interacción plasminógeno-fibrinógeno (fibrina) realizado de modo paralelo y complementario ha permitido cuantificar y aportar información fisicoquímica sobre el plasminógeno englobado en los coágulos.

A nivel de sistema purificado, actualmente no existe unanimidad sobre la cantidad de plasminógeno adsorbido al coágu

lo de fibrina, existiendo en la bibliografía una gran dispersión de datos (139). Para analizar este tipo de resultados es preciso considerar entre otros factores: el tipo de plasminógeno empleado y la manipulación de los coágulos para hacer los estudios cuantitativos.

Sobre el tipo de plasminógeno, existen resultados que demuestran que el Lys-plasminógeno se une con más afinidad a la fibrina que el Glu-plasminógeno, probablemente debido a la presencia en este último del péptido de preactivación (fragmento 1-77) (101).

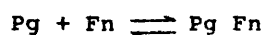
La importancia en la manipulación de los coágulos se pone de manifiesto en los resultados, en cierto modo contradictorios, de Gaffney (149) y Rampling (150, 151). Estos autores llegan a conclusiones diferentes respecto a la importancia del entrecruzamiento de la fibrina en la velocidad de lisis, comprobándose que las diferencias observadas son probablemente debidas a la influencia de este factor en las propiedades mecánicas del coágulo y por lo tanto en la manipulación de los mismos se introducen las condiciones para que la lisis sea distinta.

En nuestro trabajo se ha utilizado Lys-plasminógeno y con el fin de eliminar caracteres subjetivos o poco reproducibles en la manipulación, los coágulos se han retraído mediante centrifugación a 1.500 xg durante 30 min en tubos de 1,5 cm de diámetro, con lo cual se consiguen coágulos idénticos entre sí.

Otros factores que hay que considerar son: la manera de determinar el plasminógeno unido, esto es: si la cantidad del plasminógeno unido se obtiene por diferencia con el determinado

en el sobrenadante, después de retracción; midiendo el adsorbido en el coágulo como tal; si se utilizan proteínas marcadas (^{125}I -plasminógeno o plasminógeno marcado con tecnecio), o si el plasminógeno unido se eluye del coágulo con ácido hexanoico, etc.

En nuestros estudios, en sistema purificado y para bajas concentraciones de plasminógeno, mediante métodos analíticos se ha cuantificado el plasminógeno no unido y por diferencia con el total añadido se ha deducido el no unido. Mediante representación doble recíproca, las constantes aparentes de asociación-disociación de la interacción:



han dado unos valores de $K_a = 2,75 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ y $K_d = 3,58 \times 10^{-6} \text{ M}$, siendo dos el número de sitios que presenta el fibrinógeno para el plasminógeno (coeficiente de correlación 0,985).

Para relaciones plasminógeno/fibrinógeno (p/p) semejantes a las fisiológicas (de 1/20 a 1/10), la cantidad de plasminógeno adsorbido al coágulo es del 60% del presente antes de realizar la coagulación.

Al cuantificar por métodos radiactivos el plasminógeno directamente unido al coágulo, los valores obtenidos han sido 60%, 50% y 24%, dependiendo del grado de lavado del coágulo. El máximo valor obtenido entra dentro de los valores dados por Thorsen (152) en sistema purificado y cuantificando el plasminógeno que queda en sobrenadante (no unido $\approx 35\%$). El valor mínimo obtenido después de lavado exhaustivo entra dentro de los valo-

res dados por Lijnen (153) en sistema purificado con Lys-plasminógeno marcado con ^{125}I , determinando radiactividad en coágulo (plasminógeno unido = $25,4 \pm 1,1\%$) y Rackocsi (154) ($21,8 \pm 3\%$).

Dada la importancia de la interacción plasminógeno-fibrinógeno(fibrina), se abordó el estudio de la misma en condiciones que se salen de la situación fisiológica pero que permiten aportar información a nivel fisicoquímico. A altas concentraciones de plasminógeno, se ha estudiado la unión plasminógeno-fibrinógeno(fibrina) por métodos radiactivos (^{125}I -plasminógeno) y la interacción plasminógeno-fibrinógeno en condiciones de disolución por ultracentrifugación analítica.

Estos experimentos se han realizado en presencia del inhibidor Trasylol para evitar una posible degradación del fibrinógeno debido a las altas concentraciones de plasminógeno empleadas y a la presencia de restos de plasmina.

El Trasylol, inhibidor utilizado por otros autores (155) para evitar lo anteriormente expuesto, en las concentraciones empleadas inhibe la acción de la plasmina pero no altera las propiedades ni del fibrinógeno ni del plasminógeno, como se ha comprobado por ultracentrifugación analítica, ya que no se alteran los valores de los coeficientes de sedimentación medidos para el fibrinógeno y plasminógeno en presencia de Trasylol.

Con el fin de establecer con seguridad el número de sitios de unión de plasminógeno en la fibrina, se ha estudiado la adsorción del mismo en coágulos obtenidos con relaciones fibrinógeno/plasminógeno (M/M) de 1/1 hasta 1/8 cuantificándose el

plasminógeno libre y el plasminógeno unido a la fibrina tras lavado exhaustivo del coágulo; con estos valores y mediante representación doble recíproca y de Scatchard, se han obtenido unos valores de $K_d = 1,2 \times 10^{-5}$ M y $K_a = 0,83 \times 10^5$ M⁻¹, siendo los coeficientes de correlación de 0,996 (representación doble recíproca) y de 0,974 (representación de Scatchard).

En los estudios en ausencia de inhibidor, se pudo hacer una primera estimación del número de sitios de unión (n) que posee el fibrinógeno para el plasminógeno, dicho valor fué de dos. Pero esto no era más que una estimación pues para la obtención de este dato es imprescindible llegar a niveles de saturación de manera que se sobrepase la capacidad del sustrato de unirse a la enzima. Esta situación de saturación se consiguió en estos estudios de unión con ¹²⁵I-plasminógeno pudiendo de esta manera obtener dicho valor con certeza. Mediante representación de Scatchard, el valor obtenido para n fué de 2,4. La molécula de fibrinógeno posee dos sitios de unión para el plasminógeno, lo cual es lógico considerando la estructura simétrica del fibrinógeno.

El único dato aportado al respecto, es el dado por Cederholm Williams (156), el cual llega a la conclusión de que n=1. Esto no parece haber sido confirmado por otros autores (139) que sugieren un número de sitios de unión del plasminógeno en la fibrina mayor que 1 sin especificar su valor exacto.

Los estudios realizados por ultracentrifugación analítica de la interacción plasminógeno-fibrinógeno en las mismas condiciones en que se han hecho los estudios de unión a fibrina

en presencia de Trasylol, indican que o bien dicha interacción es lábil y fácilmente dissociable o realmente no existe, ya que las mezclas plasminógeno-fibrinógeno no presentan variación ni en los coeficientes de sedimentación ni en las concentraciones relativas de proteína, separándose las dos especies moleculares ya que sus coeficientes de sedimentación son claramente distintos.

En caso de darse una interacción estable con una cinética de disociación no muy rápida entre ambos componentes, debería de incrementarse el coeficiente de sedimentación del fibrinógeno y la concentración de plasminógeno libre observada bajo los picos schlieren debería ser menor que la añadida inicialmente.

Así pues, la interacción plasminógeno-fibrinógeno no es evidente en presencia de Trasylol, si bien dada la naturaleza de la técnica de ultracentrifugación empleada, no significa necesariamente que dicha interacción no exista en absoluto. Esto significa que la adsorción al coágulo debe de estar relacionada fundamentalmente, en este caso, con la interacción del plasminógeno con la fibrina insoluble.

Un paso más para lograr una aproximación mayor al nivel de complejidad de las condiciones fisiológicas, es el estudio del sistema fibrinolítico a nivel plasmático.

Estudios cinéticos de fibrinolisis en coágulos de plasma por activación externa con estreptoquinasa y uroquinasa ponen de manifiesto que existe un paralelismo entre los modelos plasmáticos (coágulos de plasma normal activado en tampón o en

su propio suero y coágulos de plasma reconstituido) y los modelos vistos en sistema purificado en presencia de inhibidores.

De velocidades de lisis del orden de 25 (% material lisado por hora) observadas en sistema purificado, sin inhibidores, se pasa a velocidades ocho veces más bajas con coágulos obtenidos de plasma "normal". Observándose además que, transcurridas las 24 h desde su activación, se llega a un plateau, no alcanzándose nunca la lisis total.

Se observa una mayor eficacia en la inhibición en presencia del propio suero respecto a los coágulos lisados en tampón. Esto implica que existe una acción de inhibidores que difunden desde el exterior del coágulo, y disminuyen notablemente el efecto del plasminógeno adsorbido.

Como en el caso del sistema purificado, la estreptoquinasa presenta una mayor eficacia en la lisis que la uroquinasa, sin embargo aunque las dosis empleadas de activador son teóricamente de la misma magnitud, no se produce un efecto acelerador en la velocidad de lisis al aumentar la proporción de activador. Una posible explicación de esta diferencia con lo observado en sistema purificado, está en que las proporciones relativas activador/plasminógeno son del orden de seis veces mayores, dada la pequeña cantidad de plasminógeno adsorbido en el coágulo de plasma.

Con miras a una posible proyección profiláctica en el campo de la Medicina, se modificaron las dosis o cantidades de plasminógeno en el plasma para conseguir una lisis total de coágulos plasmáticos.

Al añadir al plasma cantidades crecientes de plasminógeno antes de coagular con Ca^{2+} y trombina, se observó un ligero aumento en la velocidad de lisis inducida con estreptoquinasa. Aumento proporcional a la cantidad de plasminógeno en el plasma y en el interior del coágulo, hasta llegar a una concentración equivalente a 50-60% en exceso del plasminógeno fisiológico ($c_{pg} = 0,32$ mg/ml de plasma) para la que se produce un incremento notable y brusco en la velocidad de lisis, que por otra parte, no sigue aumentando por la presencia de cantidades mayores de plasminógeno en el plasma. Esto implica que existe una proporción de plasminógeno límite a partir de la cual la lisis no aumenta y que una cantidad muy próxima a este límite es capaz de neutralizar la acción de los inhibidores, puesto que la velocidad de lisis conseguida es del mismo orden de la observada en un sistema purificado en ausencia de inhibidores.

Se ha encontrado que el principal inhibidor de la plasmina, la α_2 -antiplasmina, se asocia a la fibrina existiendo una diferencia de $0,016 \pm 0,004$ mg/ml entre la cantidad observada en plasma ($0,069 \pm 0,006$ mg/ml) y la medida en suero ($0,053 \pm 0,007$ mg/ml) (157). La cantidad en exceso en el plasma de un 60%, produce un aumento de plasminógeno en el coágulo de 1 ml de plasma de alrededor de 0,016 a 0,019 mg, equivalentes a $1,8-2,7 \times 10^{-7}$ moles, que corresponden a los aproximadamente $2,3 \times 10^{-7}$ M de α_2 -antiplasmina adsorbida, lo que sugiere una neutralización del inhibidor por el exceso de plasmina introducido en el coágulo.

En relación con estos hechos hay que señalar que en el

presente trabajo se ha demostrado que alrededor de un 40% del plasminógeno retenido por el coágulo de plasma está unido de un modo distinto a la fibrina que el restante 60%. Este plasminógeno no es más fácilmente dissociable puesto que en los experimentos realizados con coágulos de distinta edad se vió que difundía al medio rápidamente, y lo que puede ser más significativo, su pérdida no modificaba la capacidad de lisis del coágulo cuando se activaba desde el exterior con estreptoquinasa. En otras palabras, este 40% del plasminógeno no parece eficaz en la lisis, lo que sugiere su asociación al coágulo probablemente a través del inhibidor α_2 -antiplasmina como proponen Aoki y Sakata (157, 158).

Si ésto es así, la cantidad necesaria para neutralizar toda la antiplasmina adsorbida en el coágulo, suponiendo que se mantiene la proporción del 40%, debería de ser en interior del coágulo 0,036 mg por ml de plasma coagulado, lo que se logra precisamente añadiendo un exceso del 60% de plasminógeno al plasma normal. En otras palabras, el 40% de los 0,036 mg de plasminógeno adsorbido en estas condiciones equivalen a los $2,3 \times 10^{-7}$ moles de α_2 -antiplasmina que existen en el coágulo.

Este suplemento de plasminógeno podría ser de gran utilidad a la hora de dosificar los actuales regímenes en terapia trombolítica, especialmente en aquellos casos en los que un tratamiento con anticoagulantes no está indicado. Kakkar (159) en uno de sus múltiples trabajos sobre terapia trombolítica pone de manifiesto que un régimen intermitente de estreptoquinasa y plasminógeno es más eficiente en la lisis de trombos venosos

que un régimen de estreptoquinasa sola, observándose una lisis completa de trombos en el 55% de los pacientes tratados con tal régimen. Las dosis administradas actualmente, así como la manera de hacerlo, están aún en estudio y los datos aquí aportados podrían contribuir a un mejor conocimiento del problema.

Como en el caso del sistema purificado, para cuantificar y apoyar fisicoquímicamente estos trabajos a nivel plasmático, se realizaron paralelamente estudios sobre la interacción plasminógeno-fibrinógeno(fibrina). La cuantificación de plasminógeno presente en suero no es un dato bien establecido en la bibliografía, existiendo únicamente estimaciones imprecisas.

Una de las razones de ésto ha sido la carencia de métodos (sustratos) específicos para la detección de pequeñas cantidades de plasmina en un medio rico en enzimas de acción semejante. En la actualidad existen sustratos (ej. S-2251) que permiten detectar de manera específica pequeñas cantidades de plasmina (plasminógeno activado).

En nuestro estudio, la determinación del plasminógeno presente en suero y unido al coágulo de fibrina se ha realizado tanto por métodos analíticos enzimáticos (sustrato S-2251) como radiactivos (^{125}I -plasminógeno), comprobándose que en dicha determinación van a influir distintos factores tales como la manipulación del coágulo.

La determinación en nuestro caso del plasminógeno presente en suero ha dado siempre valores del orden de 89-90% del existente en el plasma, deduciéndose que del 10 al 11% del plasminógeno está englobado en el coágulo.

Autores como Hedner (160), Ogston (161), Gottlob (162) y recientemente Sarji (163), afirman que el nivel de plasminógeno no es el mismo en suero y en plasma al no encontrar diferencias significativas en uno y otro medio. Debido a que la cantidad de plasminógeno que permanece unido al coágulo es realmente pequeña y que el volumen real del coágulo puede no ser despreciable, es necesario ajustar mucho la metodología utilizada en el sentido de hacerla reproducible para la detección de plasminógeno y encontrar diferencias significativas. Por otro lado, en el caso de los coágulos de plasma obtenidos con trombina, en presencia de Ca^{2+} , el volumen "hidratado" del coágulo puede representar alrededor del 5-6% del volumen del plasma inicial, lo que haría todavía más pequeña la diferencia de concentraciones de plasminógeno en plasma y suero.

En nuestro trabajo, el cuantificar directamente este plasminógeno unido al coágulo no ha sido posible usando el sustrato S-2251, tras sonicación del mismo, posiblemente el efecto de la sonicación inactiva o altera el plasminógeno de tal manera que no es detectable. Por otro lado la presencia de cantidades apreciables de antiplasmina (158) equivalentes a un 40% del plasminógeno todavía hace más difícil en este caso el encontrar cantidades medibles de plasmina por análisis enzimático.

La cuantificación del plasminógeno unido al coágulo por métodos radiactivos, ha dado valores de 10-11%, 8% y 6-7% dependiendo del grado de lavado, valores semejantes a los obtenidos por el mismo método por Rackoczi (154) antes ($9,4 \pm 0,5\%$) y después de eluir con 6-amino hexanoico ($4,4 \pm 0,9\%$).

La primera observación es un cierto paralelismo entre el sistema purificado y los coágulos del plasma, sobre la importancia del grado de lavado en la cuantificación del plasminógeno. La segunda observación es la pequeña cantidad de plasminógeno unida a la fibrina. De los valores normales en plasma: fibrinógeno (6 μ M), plasminógeno (2 μ M) y α_2 -antiplasmina (1 μ M) y considerando que el 30% del plasminógeno circulante está secuestrado por la α_2 -antiplasmina (164), se deduce que para que sólo el 10% del plasminógeno se una a la fibrina, la $K_d = \frac{\{Fn\}\{Pg\}}{\{FnPg\}}$ debería de ser del orden de $8,8 \times 10^{-5}$ M.

Vimos que en sistema purificado los valores de la K_d de la interacción fibrina-plasminógeno eran de $3,58 \times 10^{-6}$ M y $1,2 \times 10^{-5}$ M. Con estos valores el porcentaje de plasminógeno unido a la fibrina debería de ser el 63% en el primer caso y 41% en el segundo caso.

Por otra parte, al añadir al plasma cantidades crecientes de 125 I-plasminógeno se ha cuantificado el plasminógeno unido a la fibrina obteniéndose en estas condiciones una K_d de $4,8 \times 10^{-5}$ M.

El hecho de que la proporción de plasminógeno unido a fibrina en plasma sea muy baja, puede explicarse por un efecto combinado del inhibidor α_2 -antiplasmina y de otras proteínas plasmáticas como la glicoproteína rica en histidina, tal como indica Lijnen (165). Un plasminógeno carente de los sitios de unión Lys, empleados en la interacción con ambas proteínas en el plasma, no se une a la fibrina pero si se une en el sistema purificado, lo que indica que otras proteínas plasmáticas deben

de estar implicadas en el proceso de unión plasminógeno-fibrina como sugiere Suenson y Thorsen (155).

A nivel de interacción plasminógeno-fibrinógeno se ha visto que la unión entre plasminógeno y el fibrinógeno plasmático no debe ser muy fuerte pues el intercambio entre el plasminógeno plasmático y plasminógeno marcado añadido se realiza de una manera rápida. O en otros términos, la interacción en fase de disolución entre el plasminógeno y el fibrinógeno es más débil y fácilmente dissociable que la interacción plasminógeno-fibrinógeno, como han sugerido otros autores (106, 166).

Otra de las cuestiones más críticas y urgentes aún sin resolver sobre el sistema fibrinolítico es el hecho de que los trombos se hacen progresivamente más resistentes a los efectos de agentes trombolíticos a medida que envejecen (159, 167) de manera que, la edad de los trombos es uno de los factores más decisivos a la hora de considerar una respuesta eficaz a terapia trombolítica.

El grado de entrecruzamiento de la fibrina (149) la acción del inhibidor α_2 -antiplasmina (158), etc, han sido factores estudiados en relación con tal hecho sin llegar a ningún resultado concluyente.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo han puesto de manifiesto una clara relación entre: susceptibilidad a la lisis y contenido en plasminógeno del coágulo.

Por esta razón se estudió el efecto de la edad en este doble aspecto empleando coágulos estabilizados de fibrina procedentes de plasma, pues dichos coágulos son los más próximos a

lo que realmente ocurre en el organismo. Los resultados de la cinética de fibrinolisis, por activación extrínseca de coágulos lavados de distintas edades o grados de envejecimiento, muestran una disminución en la velocidad de lisis con la edad del coágulo. De manera que la velocidad observada con un coágulo de 18 horas es ligeramente inferior a la que se observa con un coágulo reciente ($v_{18\text{ h}} = 0,8 v_0$), decayendo bastante a las 24 h ($v_{24\text{ h}} = 0,3 v_0$). Sin embargo, a las 36 h de formados los coágulos no se lisan en absoluto.

El decaimiento observado en la capacidad de lisis se ve pues bruscamente acelerado cuando los coágulos están entre edades de 18 a 24 horas. Según distintos autores, se observa una disminución evidente en la fibrinolisis de trombos naturales para tiempos comparables a los observados en este trabajo y la explicación de este efecto se ha atribuido a distintas causas tales como: retracción del coágulo, grado de entrecruzamiento, etc, factores que posiblemente contribuyen pero no representan la causa directa.

Gottlob (168) demostró que a las 24 horas de la formación de un trombo, se produce una retracción del mismo acompañada de cambios morfológicos y de reducción de su contenido de agua. Por otra parte, Gaffney sugiere que la resistencia a la lisis se debe al grado de entrecruzamiento de la fibrina (149) sugerencia no compartida por Rampling (150), como hemos señalado anteriormente.

Estudios paralelos realizados para cuantificar el plasminógeno presente en estos coágulos de distintas edades, mues-

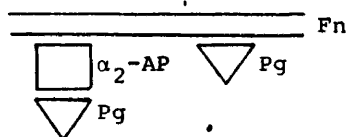
tran que del plasminógeno retenido por el coágulo, tras lavado exhaustivo del mismo, el 60% está aún presente transcurridas 4 horas, el 40% a las 22 horas, quedando sólo el 25% a las 24 horas. Existe pues una difusión del plasminógeno desde el interior del coágulo al medio, y esta difusión está acelerada de las 18 a las 24 horas. Existe pues un claro paralelismo entre la pérdida de capacidad de lisis y las cantidades decrecientes de plasminógeno que retienen los coágulos, lo que sugiere un papel importante de éste en la fibrinolisis de los mismos. Por lo tanto, una de las razones que van a influir en la resistencia a la lisis de coágulos envejecidos es el haber perdido gran parte de su plasminógeno interno, que por otra parte es el más crítico en la lisis como se ha demostrado.

La cinética de decaimiento de la capacidad de lisis parece sugerir que hay un plasminógeno que no está igualmente adsorbido (40%) y que no es eficaz en la fibrinolisis, ya que ésta no cambia con su difusión al medio, y que el otro 60% sí es eficaz pues a medida que va difundiendo, la velocidad de lisis se ve drásticamente disminuida.

La caída brusca de la cinética parece también sugerir que además de esta pérdida de plasminógeno interno hay otros fenómenos implicados en el proceso. Considerando que estamos ante un coágulo de plasma en el cual están presentes un sistema complejo de inhibidores y considerando los resultados obtenidos a nivel de mecanismo de acción, podríamos sugerir un modelo en el cual dentro del coágulo existe un plasminógeno que puede expresarse y otro plasminógeno que por estar bajo el efecto de

los inhibidores no puede hacerlo.

Aoki y Sakata (157) en unos estudios realizados con el fin de ver la influencia de la α_2 -antiplasmina en la absorción de plasminógeno a fibrina, sugieren que el plasminógeno se une a la fibrina de dos formas, una a través de la α_2 -antiplasmina y otra directamente bajo el siguiente esquema:



Según este modelo, podría ocurrir que con la "edad", el plasminógeno difunde, comenzando a difundir el plasminógeno que está asociado a la antiplasmina con lo cual la disminución en la velocidad de lisis no muestra grandes cambios, pero a partir de cierta edad (≈ 18 horas) comienza a difundir el plasminógeno realmente disponible, que aparte de ser el causante de la lisis, difunde con mayor rapidez, con lo cual la velocidad de lisis se ve bruscamente disminuida.

La razón por la cual tiene lugar esta difusión acelerada al exterior del coágulo después de 18 horas y no de un modo creciente y continuo como cabría esperar de un proceso de difusión simple, no está clara. La propia cinética de la difusión sugiere un cambio en la interacción plasminógeno-fibrina debido a una modificación a nivel molecular (o cambio conformacional) o simplemente a una competencia por el sitio de unión que ocurre precisamente después de 18 horas, en las condiciones estudiadas, y que hace que en pocas horas más, prácticamente todo

el plasminógeno salga del coágulo.

Por otro lado, los resultados obtenidos con sistema pu rificado sugieren que la difusión hacia el interior del coágulo del plasminógeno no existe o está muy dificultada o de existir no es eficaz desde el punto de vista de la fibrinólisis. Esto podría explicar que el plasminógeno adsorbido pueda salir del coágulo pero no intercambiarse con el externo a pesar de que la concentración relativa del plasminógeno en el exterior del coágulo sea mayor que en el interior del mismo.

El envejecimiento del coágulo implica la pérdida casi total del plasminógeno y por consiguiente cualquier intento de lisar el mismo ha de basarse en la activación del plasminógeno externo que se ha visto es mucho menos eficaz.

JnC

CAPITULO V.- CONCLUSIONES

- 1 - Independientemente de las hipótesis sugeridas como mecanismo fisiológico, el plasminógeno es más EFICAZ en la lisis del coágulo cuando está en el interior del mismo, al activar desde el medio con estreptoquinasa o uroquinasa.

Por otro lado, la lisis es proporcional a la cantidad de activador, siendo más rápida con estreptoquinasa que con uroquinasa para las mismas concentraciones relativas de activador.

- 2 - La velocidad de lisis, para una concentración dada de activador externo, es proporcional a la concentración relativa de plasminógeno frente a fibrinógeno hasta un valor plasminógeno/fibrinógeno (p/p) de 1:50, a partir de la cual la velocidad se hace constante.
- 3 - La acción inhibitoria del suero en la lisis es debida a la presencia de inhibidores que se adsorben al coágulo y a otros (o los mismos) inhibidores que difunden al interior del mismo.

La velocidad de lisis en presencia de los inhibidores adsorbidos aumenta proporcionalmente a la cantidad de activador añadido externamente, como en ausencia de inhibidores.

- 4.- La interacción plasminógeno-fibrina, cuando el fibrinógeno

se coagula en presencia de plasminógeno, presenta una constante de disociación $K_D = 3,58 \times 10^{-6} M$ (coágulos no lavados).

Para altas concentraciones de plasminógeno (hasta 8 moles de plasminógeno/mol fibrinógeno) y en presencia de Trasylol (inhibidor de la plasmina), se observa una $K_D = 1,2 \times 10^{-5} M$ (coágulos lavados exhaustivamente).

Con coágulos de plasma completo, la $K_D = 4,8 \times 10^{-5} M$ (coágulos no lavados).

La interacción en disolución entre el plasminógeno y el fibrinógeno, en sistema purificado, no es detectable por ultracentrifugación analítica.

- 5.- La fibrina posee dos sitios de unión para el plasminógeno, lo que está de acuerdo con el carácter dimérico de la molécula.
- 6.- Existe un paralelismo entre las cinéticas de lisis de coágulos plasmáticos y coágulos de fibrina purificada en presencia de inhibidores. La velocidad de lisis en dichos coágulos disminuye ocho veces con respecto a coágulos de fibrina en ausencia de inhibidores, no alcanzándose nunca su lisis total.

La lisis es ligeramente más rápida con estreptoquinasa que con uroquinasa para las mismas concentraciones relativas de activador a diferencia de lo observado con fibrina purificada. Sin embargo, las cantidades relativas de activador utilizadas en los coágulos de plasmina son lo suficientemente elevadas para que no se observe ningún aumento en

la velocidad de lisis al aumentar la concentración de activador.

7.- Como en el caso de sistema purificado se observa un retraso en la lisis de coágulos de plasma por la acción de inhibidores que difunden desde el exterior al coágulo. Lo que demuestra también en este caso que los inhibidores de la lisis, en parte se adsorben en el coágulo y en parte difunden eficazmente al interior del mismo.

8.- La adición al plasma de cantidades crecientes de plasminógeno antes de coagular con Ca^{2+} y trombina, produce un aumento proporcional en la velocidad de lisis, así como en la cantidad de plasminógeno adsorbido. Sin embargo, una concentración en exceso del 50-60% del plasminógeno fisiológico (concentración total = 0,32 mg/ml de plasma) produce un incremento brusco y notable en la velocidad de lisis (disolución total en \approx 5 horas), que por otra parte, no sigue aumentando al añadir cantidades mayores de plasminógeno al plasma.

El exceso de plasminógeno en plasma, necesario para observar este efecto, produce un incremento de plasminógeno en el interior del coágulo equivalente a la α_2 -antiplasmina adsorbida en el mismo.

9.- Coágulos de plasma de distintas edades (tiempo desde su formación) muestran una disminución en la velocidad de lisis por activación externa con estreptoquinasa.

La capacidad de lisis decae bruscamente para edades de

18 a 24 horas, anulándose prácticamente para edades superiores a 36 horas.

- 10.- Se demuestra una difusión del plasminógeno desde el interior del coágulo al medio que está acelerado entre las 18 y las 24 horas, haciéndose muy pequeña la cantidad de plasminógeno adsorbido en el coágulo para tiempos mayores. Existe , pues, un claro paralelismo entre la pérdida de capacidad de lisis y las cantidades decrecientes de plasminógeno que retienen los coágulos.

145

CAPITULO VI.- B I B L I O G R A F I A

- (1) MORAWITZ, P. (1968)
en The Chemistry of Blood Coagulation. (Thomas, ed.)
Vol. I, p. 11, Springfield.
- (2) ASTRUP, T. (1958)
Thromb. Diath. Haemorrh. (Stuttg.) 2, 347.
- (3) HJORT, P.F. y HASSELBACK, R. (1961)
Thromb. Diath. Haemorrh. (Stuttg.) 6, 580.
- (4) STORMORKEN, H. (1980)
Acta Med. Scand. Suppl. 642, 131.
- (5) VANE, J.R. y MONCADA, S. (1980)
Acta Med. Scand. Suppl. 642, 11.
- (6) DYERBERG, J. y BANG, H.O. (1979)
Lancet 1, 433.
- (7) GLASGOW, J.G., SCHADE, R. y PITLICK, A. (1978)
Thromb. Res. 13, 255.
- (8) HEINS, A., du P., VAN DER BERG, D.J., POTGIETER, G.M. y
RETIEF, F.P. (1974)
Thromb. Diath. Haemorrh. (Stuttg.) 32, 417.
- (9) HEDNER, U. (1978)
Seventeenth Congress Int. Soc. Haematol., Paris.
(Abstract p. 302).
- (10) KARACA, M., CRONBERG, L. y NILSSON, I.M. (1972)
Scand. J. Haematol. 9, 465.

- (11) HARKER, L.A., ROSS, R. SCHLICHTER, S.J. y SCOTT, C.R.
(1976)
J. Clin. Invest. 58, 731.
- (12) NORDØY, A. (1980)
Acta Med. Scand. Suppl. 642, 113.
- (13) ERIKSSEN, J., HELLEM, A. y STORMORKEN, H. (1977)
Thromb. Haemost. 38, 606.
- (14) HORNS, D.J., GERRARD, J.M., RAO, G.H.R., KRIVIT, W. y
WHITE, J.O. (1976)
Thromb. Res. 9, 661.
- (15) ZIBOH, V.A., MARUTA, H., LORD, J., CAGLE, W.D. y
LUCKI, W. (1979)
Europ. J. Clin. Invest. 9, 223.
- (16) GRYGLEWSKI, R.J., DEMBINSKA-KIEC, A., ZMUDA, A. y
GRUGLEWSKA, T. (1978)
Atherosclerosis 31, 385.
- (17) EGEBERG, O. (1965)
Thrombos. Diath. Haemorrh. (Stuttg.) 13, 516.
- (18) GASTON, L.W. (1966)
Pediatrics 68, 376.
- (19) EGEBERG, O. (1967)
Thromb. Diath. Haemorrh. (Stuttg.) 17, 176.
- (20) VESSEY, M.P. (1973)
en Recent Advances in Thrombosis. (L. Poller, ed.).
p. 39. Churchill Livingstone, London.
- (21) FAGERHOL, M.K., ABILDGAARD, U. y KORNSTAD, L. (1971)
Lancet 2, 664.

- (22) KORSAN-BENGTSEN, K., WILHELMSEN, L., NILSSON, L.A. y
TIBBLIN, G. (1972)
Thromb. Res. 1, 549.
- (23) ISACSON y NILSSON, I.M. (1972)
Acta Clin. Scand. 138, 313.
- (24) NILSSON, I.M., KROOK, H. y STERNBY, N.H. (1961)
Acta Med. Scand. 169, 323.
- (25) AOKI, N., MOROI, M., SAKATA, Y., YOSHIDA, N. y
MATSUDA, M. (1978)
J. Clin. Invest. 61, 1186.
- (26) AOKI, N., SAITA, H., KAMIYA, T., KOIE, K. y SAKATA, Y.
(1979)
J. Clin. Invest. 63, 877.
- (27) CEDERHOLM-WILLIAMS, S.A., DORNAN, T.L. y TURNER, R.C.
(1981)
Eur. J. Clin. Invest. 11, 133.
- (28) KERNOFF, P.B.A. y McNICOL, G.P. (1977)
Brit. Med. Bull. 33, 239.
- (29) METTINGER, K.L., NYMAN, D., KÄLLIN, K.G., SIDEN, A. y
SÖDERSTRÖM, C.E. (1979)
J. Neurol. Sci. 41, 31.
- (30) ASTRUP, T. (1978)
En Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis.
(Davidson, J.F., Rowen, R.M., Samama, M.M., Desnoyers, P.C.,
eds.) Vol. 3, p. 1-57. Raven Press, New York.
- (31) REICH, E. (1975)
En Proteases and Biological Control (Reich, E., Rifkin, D.B.,

Show, E., eds.) p. 3341. Cold Spring Harbor Laborat.

- (32) STRICKLAND, S. (1978)

En Regulatory Proteolytic Enzymes and their Inhibitors.
(Magnusson, S., Ottesen, R., Foltman, B., Dand, K., Neurath, H., eds.) pp. 181-185. Pergamon Press, Oxford.

- (33) ASTRUP, T. (1956)

Blood 11, 781.

- (34) FEARNLEY, G.R. (1973)

Adv. Drug Res. 7, 107.

- (35) MILSTONE, H. (1941)

J. Immunol. 42, 109.

- (36) TILLET, W.S. y GARNER, R.L. (1933)

J. Exp. Med. 58, 485.

- (37) KAPLAN, M.H. (1944)

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 57, 40.

- (38) CHRISTENSEN, L.R. (1945)

J. Gen. Physiol. 28, 363.

- (39) CHRISTENSEN, L.R. y MACLEOD, C.M. (1945)

J. Gen. Physiol. 28, 559.

- (40) ASTRUP, T. y PERMIN, P.M. (1947)

Nature 159, 681.

- (41) McFARLANE, R.G. y PILLING, J. (1947)

Nature 159, 779.

- (42) WILLIAMS, J.R.B. (1951)

Brit. J. Exper. Pathol. 32, 530.

- (43) MÖLLERTZ, S. (1953)

Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 82, 291.

- (44) WALLEN, P. (1977)
en Thrombosis and urokinase. (Paoletti, R., Sherry, S.,
eds.) pp. 91-102. Academic Press, London.
- (45) RIJKEN, D.C., WIJNGAARDS, G., ZAAL-de-JONG, M. y
WELBERGEN, J. (1979)
Biochim. Biophys. Acta 580, 140.
- (46) NIEWIAROWSKI, S. y PROU-WARTELLE, O. (1959)
Thromb. Diath. Haemorrh. 3, 543.
- (47) GRIFFIN, J.H. (1977)
Thromb. Haemost. (Abstr.) 38, 50.
- (48) GRIFFIN, J.H. (1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 1998.
- (49) KAPLAN, A.P., CASTELLINO, F.J., COLLEN, D., WIMAN, B. y
TAYLOR, F.B. (1978)
Thromb. Haemost. 39, 263.
- (50) KLUFT, C. (1977)
Haemostasis 6, 351.
- (51) STEAD, N., KAPLAN, A.P. y ROSENBERG, R.D. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 6481.
- (52) McCONNELL, D.J. (1972)
J. Clin. Invest. 51, 1611.
- (53) GUREWICH, V., HYDE, E. y LIPINSKI, B. (1975)
Blood 46, 555.
- (54) COLLEN, D. (1979)
Lancet 1, 1039.
- (55) COLLEN, D. (1976)
J. Biochem. 69, 209.

- (56) MOROI, M. y AOKI, N. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 5956.
- (57) MÜLLERTZ, S. y CLEMMENSEN, I. (1976)
Biochem. J. 159, 545.
- (58) BAGGE, L. BJÖRK, I., SALDEEN, T. y WALLIN, R. (1976)
Forensic Sci. 7, 83.
- (59) MÜLLERTZ, S. (1974)
Biochem. J. 143, 273.
- (60) SOTTRUP-JENSEN, L., CLAEYS, H., ZAJDEL, M., PETERSEN, T.E.
y MAGNUSSON, S. (1978)
En Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis.
(Davidson, J.F., Rowan, R.M., Samama, M.M. y Desnoyers,
P.C., eds.). Vol. 3, pp. 191. Raven Press, New York.
- (61) SOTTRUP-JENSEN, L., PETERSEN, T.E. y MAGNUSSON, S. (1978)
En Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol. 5,
Suppl. 3, p. 91.
- (62) WIMAN, B. (1978)
En Fibrinolysis. Current fundamental and clinical aspects.
(Gaffney, P.J. y Kalkuv-Ulutin, S., eds.). pp. 47. Academic Press, London.
- (63) WIMAN, B. (1973)
Emp. J. Biochem. 39, 1.
- (64) WALLEN, P. y WIMAN, B. (1970)
Biochim. Biophys. Acta 221, 20.
- (65) WALLEN, P. y WIMAN, B. (1972)
Biochim. Biophys. Acta 257, 122.

- (66) BRUNISHOLZ, A. , LERCH, G., SCHALLER, J. et al. (1981)
Eur. J. Biochem. 114, 465.
- (67) WIMAN, B. (1977)
Eur. J. Biochem. 76, 124.
- (68) WIMAN, B. y WALLEN, P. (1975)
Eur. J. Biochem. 50, 489.
- (69) RICKLY, E.E. y OTA SKY, W.I. (1975)
Eur. J. Biochem. 50, 441.
- (70) MARKUS, G., PRIORE, R.L. y WINSLER, F.C. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 1211.
- (71) WIN, E.S., HU, S.P., HOCHSCHWENDER, S.M. y LAURSEN, P.A.
(1980)
Eur. J. Biochem. 104, 579.
- (72) WIMAN, B. y COLLEN, D. (1978)
Nature (London) 272, 549.
- (73) DEUTSCH, D.G. y MERTZ, E.T. (1970)
Science 170, 1095.
- (74) COLLEN, D. y DE MAEYER, L. (1975)
Thromb. Diath. Haemorrh. 34, 396.
- (75) CASTELLINO, F.J., SIEFRING, G.E. Jr. y SODETZ, I.M. (1973)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 845.
- (76) SJÖHOLM, I., WIMAN, B. y WALLEN, P. (1973)
Eur. J. Biochem. 39, 471.
- (77) RATNOFF, O.D. (1977)
En Haemostasis: Biochemistry, Physiology and Pathology.
(Ogston, D. y Bennett, B., eds.) pp. 25. John Wiley and
Sons, London.

- (78) OGSTON, D. y BENNETT, B. (1978)
Brit. Med. Bull. 34, 107.
- (79) HEDNER, U. (1973)
Thromb. Diath. Haemorrh. 30, 414.
- (80) HEDNER, U. y MARTINSSON, G. (1978)
Thromb. Res. 12, 1015.
- (81) ASTRUP, T. (1966)
Fed. Proc. 25, 42.
- (82) COLE, E.R. y BACHMAN, F.W. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 3729.
- (83) WALLEN, P., KOK, P. y RANBY, M. (1978)
En Regulatory Enzymes and their Control. (Magnusson, S.,
Ottesen, M., Foltman, B., Danø, K. y Neurath, H., eds.)
pp. 127. Pergamon Press, Oxford.
- (84) RICKLI, E.E. y ZAUGG, G. (1970)
Thromb. Diath. Haemorrh. 23, 64.
- (85) RIJKEN, D.C., WIJNGAARDS, G., ZAAL-de-JONG, M. y
WELBERGEN, J. (1979)
Biochim. Biophys. Acta 580, 140.
- (86) RADCLIFFE, R. y HEINZE, T. (1978)
Arch. Biochem. Biophys. 189, 185.
- (87) GUREWICH, V., HYDE, E. y LIPINSKI, B. (1975)
Blood 46, 555.
- (88) CAMIOLO, S.M., THORSEN, S. y ASTRUP, T. (1971)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 138, 277.
- (89) MÜLLERTZ, S. y LASSEN, M. (1953)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 82, 264.

- (90) BROGDEN, R.N., SPEIGHT, T.M. y AVERY, G.S. (1973)
Drugs 5, 357.
- (91) VERSTRAETE, M.A. (1979)
En Fibrinolysis. (Kline, D.L. y Reddy, N.N., eds.).
CRS Press, Cleveland.
- (92) WIMAN, B. y WALLEN, P. (1973)
Eur. J. Biochem. 36, 25.
- (93) WIMAN, B. y COLLEN, D. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 9291.
- (94) GAFFNEY, P.J. y BRASHER, M. (1977)
Haemostasis 6, 72.
- (95) CHRISTENSEN, U. (1977)
Biochim. Biophys. Acta 481, 638.
- (96) WOHL, R.C., SUMMERIA, L., ARZADON, L. y ROBBINS, K.C. (1978)
J. Biol. Chem. 253, 1402.
- (97) SHOTTON, D.M. y HARTLEY, B.S. (1970)
Nature (London) 225, 802.
- (98) MAGNUSSON, S., PETERSEN, T.E., SOTTRUP-JENSEN, L. y
CLAEYS, H. (1975)
En Proteases and Biological Control. (Reich, E., Rifkin,
D.P. y Shaw, E., eds.). pp. 123. Cold Spring Harbor Labo-
ratory.
- (99) TITANI, K., FUJIKAWA, K., ENFIELD, D.L., ERICSSON, L.H.,
WALSH, K.A. y Neurath, H. (1975)
Proc. Natl. Acad. Sci. N.Y. 72, 3082.
- (100) HUSEBY, R.M. y SMITH, R.E. (1980)
Seminars in Thrombosis and Haemostasis. Vol. VI, n°3, pp.173.

- (101) LERCH, P.G., RICKLI, E.E., LERGIER, W. y GILLESSEN, D.
(1980)
Eur. J. Biochem. 107, 7.
- (102) LERCH, P.G. y RICKLI, E.E. (1980)
Biochim. Biophys. Acta 625, 374.
- (103) ALKJAERSIG, N., FLETCHER, A.P. y SHERRY, S. (1959)
J. Clin. Invest. 38, 1086.
- (104) AMBRUS, C.M. y MARKUS, G. (1960)
Amer. J. Physiol. 199, 491.
- (105) CHESTERMAN, C.N., ALLINGTON, M.J. y SHARP, A.A. (1972)
Nature 388, 15.
- (106) COLLEN, D. (1980)
Thromb. and Haemost. 43(2), 77.
- (107) FLETCHER, A.P., ALKJAERSIG, N., SHERRY, S., GENTON, E.,
HIRSH, J. y BACHMANN, F. (1965)
J. Lab. Clin. Med. 65, 713.
- (108) VERSTRAETE, M., VERMYLEN, J., AMERY, A. y VERMYLEN, C.
(1966)
Brit. Med. J. 5485, 454.
- (109) KAKKAR, V.V., SAGAR, S. y LEWIS, M. (1975)
Lancet ii, 674.
- (110) BROCHIER, M., PLANIOL, T., GRIGUER, P., RAYNAUD, Ph.,
FAUCHIER, J.P., CHARBONNIER, B., LATOUR, F. y
PELLOIS, A. (1977)
Coeur Med. Interne 16, 513.
- (111) MARBET, G.A., WALTER, M., SIX, P., NYMAN, D., RÜST, O.,
BILAND, L., DUCKERT, F., NADAR, G., Da SILVA, A., WIDMER,

- L.K., SMITH, U.E. y VOKAL, J. (1976)
En Blutgerinnung und Antikoagulation. (Nenhaus, K. y
Duckert, F., eds.). Schattauer Verlag, Stuttgart, p. 87.
- (112) BROWN, E.M. y ROTHSTEIN, F. (1967)
Science 155, 1017.
- (113) MIHALYI, E. y ALBERT, A. (1971)
Biochemistry 10, 237.
- (114) LAKI, K. (1951)
Arch. Biochem. Biophys. 32, 317.
- (115) FERRY, J.D. y MORRISON, P.R. (1947)
J. Am. Chem. Soc. 69, 388.
- (116) BLOMBÄCK, B. (1968)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 146, 364.
- (117) FERRY, J.D. (1952)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 38, 566.
- (118) SCHWARTZ, M.L., PIZZO, S.V., HILL, R.L. y MCKEE, P.A. (1971)
J. Clin. Invest. 50, 1506.
- (119) HENSCHEN, A. y EDMAN, P. (1971)
Biochim. Biophys. Acta 263, 351.
- (120) WEBER, K. y OSBORN, M. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 4406.
- (121) WEBER, K., BRINGLE, J.R. y OSBORN, M. (1972)
En Methods in Enzymology. (Hirs, C.H.W. y Timasheff, S.N.,
eds.) Vol. XXVI, part C, pp. 3. Academic Press, New York.
- (122) ALLISON, J.H., AGRAWAL, H.C. y MOORE, B.W. (1974)
Anal. Biochem. 58, 592.

- (123) McKEE, P.A., MATTOCK, P. y MILL, R.L. (1970)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 66, 734.
- (124) RODBARD, D., REYNOLDS, J.A. y TANFORD, C. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 5856.
- (125) ROBBINS, K.C., SUMMERIC, L., ELWYN, D. y BARLOW, G.H. (1965)
J. Biol. Chem. 240, 541.
- (126) GREENWOOD, F.C. y HUNTER, W.M. (1963)
Biochem. J. 89, 114.
- (127) BELL, W.R. (1975)
Semin. Thromb. Haemost. 2, 1.
- (128) BARLOW, G.B. (1976)
En Methods in Enzymology. (Lorand, L., ed.) Vol. XLV,
p. 241. Academic Press, New York.
- (129) REDDY, K.N.N. y MARKUS, G. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 1683.
- (130) McCLINTOCK, D.K. y BELL, P.H. (1971)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 694.
- (131) WEINSTEIN, M.J. y DOOLITTLE, R.F. (1972)
Biochim. Biophys. Acta 258, 577.
- (132) JOHNSON, A.J., KLINE, D.L. y ALKJAERSIG, N. (1969)
Thromb. Diath. Haemorrh. 21, 259.
- (133) SILVERSTEIN, R.M. (1973)
Thromb. Research 3, 729.
- (134) WALSH, K.A. (1970)
En Methods in Enzymology. (Perlman, G.E. y Lorand, L.,
eds.) Vol. XIX, pp. 42. Academic Press, New York.

- (135) CHRISTENSEN, L.R. y MÜLLERTZ, S. (1974)
Biochim. Biophys. Acta 334, 187.
- (136) HUSEBY, R.M. y SMITH, R.E. (1980)
En Seminars in Thrombosis and Haemostasis. Vol. VI, N° 3,
p. 173.
- (137) FRIBERGER, P., KNÖS, M., GUSTAVSSON, S., AMELL, L. y
CLAESON, G. (1978)
Haemostasis 7, 138.
- (138) TAKADO, A, URANO, T. y TAKADO, Y. (1979)
Thromb. Haemost. 42, 901.
- (139) JUHAN-VAGUE, I., CALAS, M.F., ROUX, F. y JUHAN, C (1981)
Thromb. Haemost. (Stuttg.) 45(2), 154.
- (140) SCATCHARD, G. (1949)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660.
- (141) SUMMARIA, L. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 3988.
- (142) SHAW, D.J. (1975)
En Introducci3n to Colloid and Surface Chemistry. 2nd ed.
Butterworths and Col., publisher. (Ed. London). pp. 26.
- (143) KAY, D. y CUDDIGAN, B.J. (1967)
Brit. J. Haematol. 13, 341.
- (144) BLOMBÄCK, B. y YAMASHINA, J.A. (1958)
Arkiv Kemi 12, 299.
- (145) MURANO, G., WIMAN, B., BLOMBÄCK, B. y BLOMBÄCK, S.M. (1971)
FEBS Letters 14, 37.
- (146) MCKEE, P.A., MATTOCK, P. y HILL, R.L. (1970)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66, 738.

- (147) CASPARY, E.A. y KERWICK, R.A. (1957)
Biochem. J. 67, 41.
- (148) CARLIN, G. (1980)
Upsala J. Med. Sci. 85, 29.
- (149) GAFFNEY, P.J. y WHITAKER, A.N. (1979)
Thromb. Res. 14, 85.
- (150) RAMPLING, M.W. (1978)
Thromb. Res. 12, 287.
- (151) RAMPLING, M.W. y FLEXMAN, C. (1979)
Thromb. Res. 16, 877.
- (152) THORSEN, S. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 393, 55.
- (153) LIJNEN, H.R., VAN HOEF, B. y COLLEN, D. (1981)
Eur. J. Biochem. 120, 149.
- (154) RAKOCZI, I., WIMAN, B. y COLLEN, D. (1978)
Biochim. Biophys. Acta 540, 295.
- (155) SVENSON, E. y THORSEN, S. (1981)
Biochem. J. 197, 619.
- (156) CEDERHOLM WILLIAMS, S.A. (1977)
Thromb. Res. 11, 421.
- (157) DOKI, N. y SAKATA, Y. (1980)
Thromb. Res. 19, 149.
- (158) SAKATA, Y. y DOKI, N. (1980)
J. Clin. Invest. 65, 290.
- (159) KAKKAR, V.V. (1978)
En Fibrinolysis: Current Fundamental and Clinical Concepts. (Gaffney, P.J. y Balkuv-Ulutin, S., eds.), pp. 191.

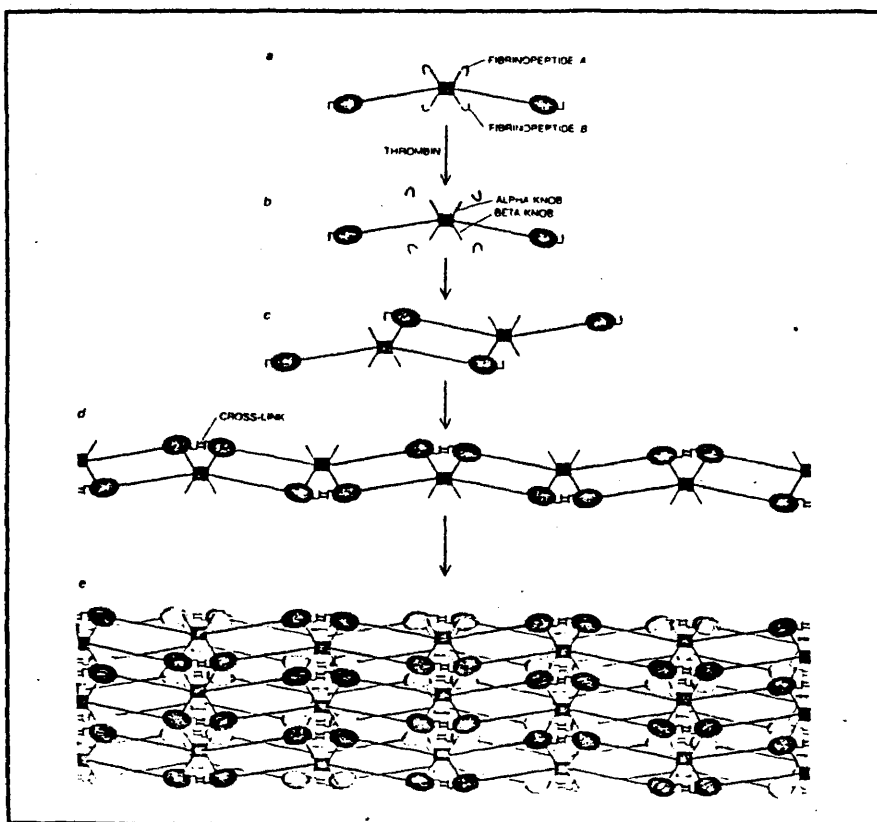
Academic Press.

- (160) HEDNER, U., NILSSON, I.M. y ROBERTSON, B. (1966)
Thromb. Diath. Haemorrh. 16, 38.
- (161) OGSTON, C.M., OGSTON, D. y ROBERTSON, H.W. (1968)
Thromb. Diath. Haemorrh. 19, 107.
- (162) GOTTLÖB, R. y BLUMEL, G. (1966)
Thromb. Diath. Haemorrh. 15, 570.
- (163) SARJI, N.M., LIN, P.I., TEAFORD, M.J. y CROOK, L. (1981)
Ann. Clin. and Lab. Science 11(5), 422.
- (164) COLLEN, D. (1980)
En Blood Coagulation and Haemostasis. A Practical Guide.
(Thomson, J.M., ed.) 2nd ed. pp. 269. Churchill Living-
stone, London.
- (165) LIJNEN, H.R., HOYLAERTS, M. y COLLEN, D. (1980)
J. Biol. Chem. 255(21), 10214.
- (166) SHEN, L.L. y McDONAGH, R. (1977)
J. Clin. Invest. 252(17), 6184.
- (167) KAKKAR, V.V. y SCULLY, M.F. (1978)
Brit. Med. Bull. 34(2), 191.
- (168) GOTTLÖB, R., STOCKINGER, L., ROTLING, U. y SCHATTERMAN, G.
(1971)
Thromb. Diath. Haemorrh. 25, 352.

161

APENDICE I.- FORMACION DE FIBRINA

1.- Esquema de polimerización de acuerdo con los datos estructurales y los obtenidos por microscopía electrónica (R.F. Doolittle: Scientif. Amer. 245, 92 (1981)).



Fibrinógeno (a) se transforma en monómero de fibrina (b). Estos monómeros se agregan según (c) para formar polímeros intermedios (d) que a su vez se asocian lateralmente para dar lugar a la fibra de fibrina (e) que constituye la trama del coágulo.

2.- Microscopía electrónica de fibrina procedente de
fibrinógeno puro.



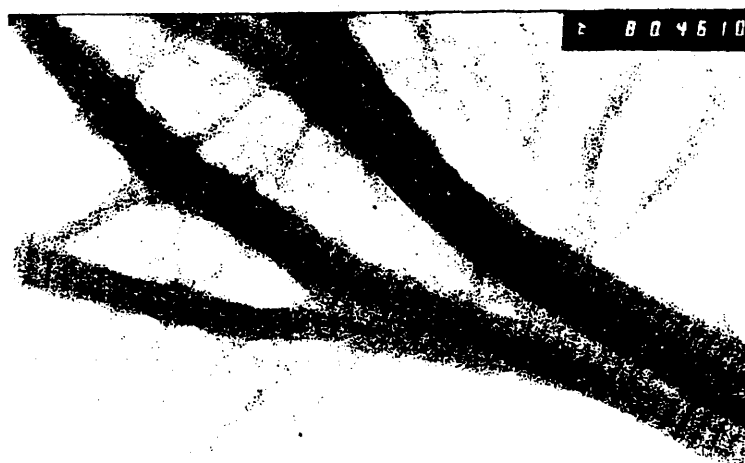
20.000 aumentos



60.000 aumentos



60.000 aumentos

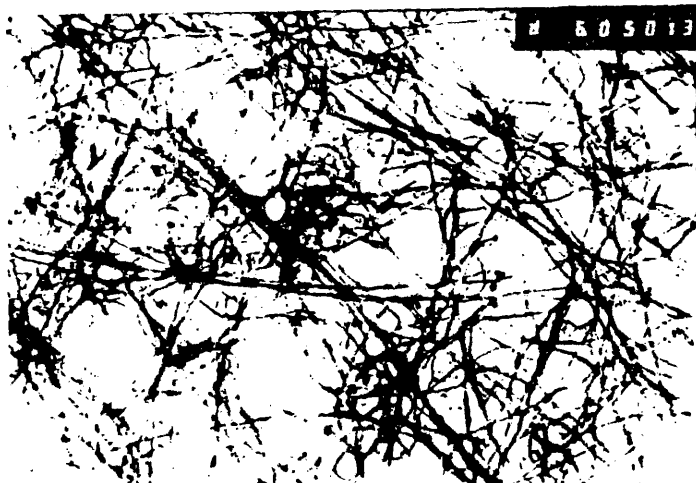


80.000 aumentos

3.- Microscopía electrónica de fibrina procedente de plasma humano.



60.000 aumentos



6.000 aumentos



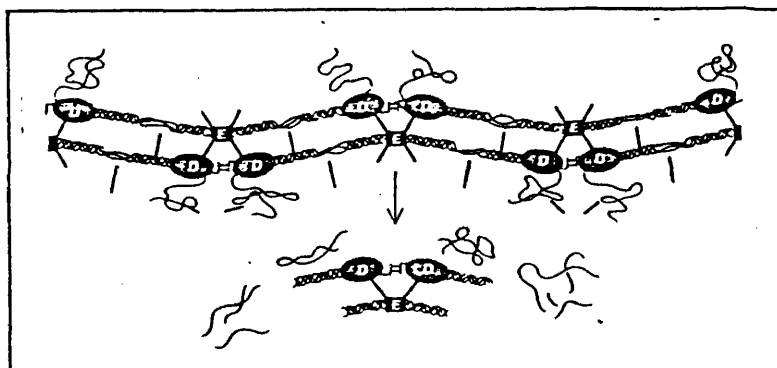
8.000 aumentos

167

APENDICE II.- LISIS DE FIBRINA

1.- Esquema de lisis de coágulos de fibrina estabilizada por acción de la plasmina (R.F. Doolittle: Scientif. Amer. 245, 92 (1981)).

La enzima tiene fácil acceso a las zonas de la molécula "coiled-coil". El fragmento $D_2 E$ es el producto final de la digestión con plasmina.



2.- Aspectos macroscópicos de fibrinolisis.

Lisis de fibrina procedente de fibrinógeno puro (A) y de plasma humano (B).

